



Tesis - SB142502

Bakteri Karbonatogenik Sebagai Agen Biosemen Untuk Alternatif Memperbaiki Retakan Beton

MUHAMMAD ANDRY PRIO UTOMO
NRP.1515 201 205

DOSEN PEMBIMBING
Dr. Enny Zulaika, M. P.
Ridho Bayuaji, S.T., M.T., Ph.D.

PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018

LEMBAR PENGESAHAN


Bakteri Karbonatogenik Sebagai Agen Biosemen Untuk Alternatif Memperbaiki
Retakan Beton


Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si.)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

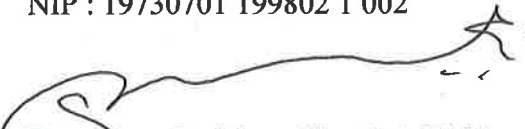
Oleh
Muhammad Andry Prio Utomo
NRP : 1515201205

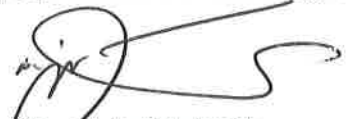
Tanggal Ujian : 25 Januari 2018
Periode Wisuda : Maret 2018

Disetujui oleh :


1. Dr. Enny Zulaika, M.P. (Pembimbing I)
NIP: 19600109 198803 2 001


2. Ridho Bayuaji, S.T., M.T., Ph.D. (Pembimbing II)
NIP : 19730701 199802 1 002


3. Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si. (Penguji I)
NIP: 19690907 199803 2 001


4. Dr. Nurul Jadid, M.Sc. (Penguji II)
NIP : 19820512 200501 1 002

Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Dekan,




Prof. Dr. rer. nat. Agus Rubiyanto, M. Eng. Sc.
NIP: 19650619 198903 1 001

BAKTERI KARBONATOGENIK SEBAGAI AGEN BIOSEMEN UNTUK ALTERNATIF MEMPERBAIKI RETAKAN BETON

Nama : Muhammad Andry Prio Utomo
NRP : 1515 201 205
Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, M. P.
Ridho Bayuaji, S.T., M.T., Ph.D.

ABSTRAK

Beton merupakan struktur bangunan dengan bahan dasar semen yang banyak mengandung CaCO_3 . Beton dapat mengalami retakan kecil, apabila dibiarkan akan mengakibatkan kerusakan struktur beton. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk memperbaiki retakan kecil pada beton adalah mengisi dengan *filler* sintetik. Penggunaan *filler* sintetik kurang efektif karena aplikasinya lebih dari satu kali dan mudah terdegradasi. Bakteri karbonatogenik dapat membentuk CaCO_3 , sehingga dapat dijadikan alternatif pengganti *filler* sintetik. Metode ini lebih ramah lingkungan dan relatif lebih murah. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode sebar pada medium *Calcium Carbonate Precipitation* agar. Uji produksi kristal CaCO_3 menggunakan metode penimbangan. Karakter kristal CaCO_3 divisualisasi menggunakan *X-Ray Diffraction* dan *Scanning Electron Microscopy*. Identifikasi spesies bakteri dilakukan secara molekuler dengan marker gen 16S rRNA, rekonstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan software MEGA 7.0. Keberadaan gen *ureC* dalam genom bakteri diketahui melalui PCR. Selanjutnya isolat bakteri karbonatogenik diaplikasikan pada retakan beton dan kemampuan isolat merekatkan retakan beton dicitrakan dengan mikroskop stereo.

Hasil isolasi mendapatkan 6 isolat bakteri yang mampu memproduksi kristal CaCO_3 yaitu JA1, JB2, JB3, JA4, AK4, dan SU1. Keenam isolat mampu memproduksi kristal CaCO_3 dengan berat diatas 275 mg/50 ml medium CCP cair. Terdapat lima isolat bakteri yang mampu memproduksi kalsit yaitu JA1, JB2, JA4, AK4, dan SU1, dan JB3 yang kristal dengan bentuk vaterit. Berdasarkan marka gen 16S rRNA isolat JA1 merupakan *Bacillus huizhouensis*, isolat JB2 merupakan *Lysinibacillus boronitolerans*, isolat JB3 merupakan *Bacillus galactosidilyticus*, isolat JA4 merupakan *Sporosarcina* spp., isolat AK4 merupakan *Bacillus niacini*, dan isolat SU1 merupakan *Bacillus lentus*. Pada deteksi gen *ureC* semua isolat uji menunjukkan pita DNA gen *ureC* dengan berat molekul 340 bp yang mengkode urease sub-unit α . Semua isolat mampu menutup retakan mikro (<0.25 mm) pada beton kecuali JB3, sehingga Isolat JA1, JB2, JA4, AK4, dan SU1 dapat digunakan sebagai agen biofiller retakan beton. Untuk meningkatkan kemampuan isolat tersebut dalam merekatkan beton dibutuhkan suatu perlakuan tambahan, berupa enkapsulasi sel pada matriks pembawa.

Kata kunci : Bakteri, *biofiller*, CaCO_3 , 16S rRNA, *ureC*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

CARBONATOGENIC BACTERIA AS BIOCEMENT FOR ALTERNATIVE CRACKS REPAIRMENT ON CONCRETE

Student name : Muhammad Andry Prio Utomo
Student ID : 1515 201 205
Supervisor : Dr. Enny Zulaika, M. P.
Ridho Bayuaji, S.T., M.T., Ph.D.

ABSTRACT

Concrete is a building structure with cement base material which contains large amount of CaCO_3 . Microcracks easily appears on concrete surface, yet if it left unchecked can lead to concrete structure damage. Some methods usually used in repairing microcracks on concrete surface are to fill in with the synthetic fillers. The use of synthethic fillers is considered less effective because it requires multiple activity to complete and it is easily degraded. Carbonatogenic bacteria can form CaCO_3 , so it can be more applicable as an alternative to synthetic filler. This method is considerably more environmental friendly and relatively cheaper. Isolation process was conducted by spread plate methods on Calcium Carbonate Precipitation agar. The test of CaCO_3 crystal production was conducted by weighing method. Characters of CaCO_3 crystal were visualized by using X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy. Identification of bacteria species was done molecularly with gene marker of 16S rRNA, the phylogenetic tree of species was reconstructed using MEGA 7.0. The existence of *ureC* gene in bacterial genome was carried out by PCR methods. Furthermore, isolates were applied on concrete cracks and the bacteria isolate ability in sealing cracks on concrete was visualized using stereo microscopy.

Isolation process obtained 6 bacterial isolates which capable to produce crystal CaCO_3 , those are isolate JA1, JB2, JB3, JA4, AK4, and SU1. All bacteria isolates are capable to produce CaCO_3 crystals more than 275 mg/ 50 ml of liquid CCP medium. There are 5 bacterial isolates that capable to produce calcite form, those are JA1, JB2, JA4, AK4, and SU1, and only JB3 produces crystals with vaterite form. Regarding 16S rRNA sequences, isolate JA1 is *Bacillus huizhouensis*, JB2 isolate is *Lysinibacillus boronitolerans*, JB3 isolate is *Bacillus galactosidilyticus*, JA4 isolate is *Sporosarcina* spp., AK4 isolate is *Bacillus niacini*, and SU1 isolate is *Bacillus lentus*. The result of *ureC* gene detection represent all bacteria isolates showed 340 bp DNA band which encode α sub-unit of urease. All bacteria isolates capable to seal concrete microcracks (<0.25 mm), except JB3. So that isolates JA1, JB2, JA4, AK4, and SU1 can be applied as biofiller agent to seal concrete microcracks. In order to increase the ability of bacteria isolates on sealing concrete microcracks, encapsulation into carrier matrix is required.

Key words : Bacteria, biofiller, CaCO_3 , 16S rRNA, *ureC*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul “Bakteri Karbonatogenik Sebagai Agen Biosemen Untuk Alternatif Memperbaiki Retakan Beton”.

Penyusunan Tesis ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Oleh sebab itu penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu yaitu:

1. Ketua Departemen Biologi ITS atas dukungan dan arahan kepada penulis.
2. Dr. Enny Zulaika M.P. sebagai dosen pembimbing pertama dan Ridho Bayuaji, S.T., M.T., Ph.D sebagai dosen pembimbing kedua yang selalu memberikan semangat, waktu, serta bimbingan dalam menyusun laporan tesis.
3. Dr.rer.nat.Ir. Maya Shovitri M.Si. dan Dr. Nurul Jadid M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penulisan laporan tesis ini supaya menjadi lebih baik.
4. Laboratorium TDDC ITD dan Laboratorium Molekuler RSPTI Surabaya yang telah mendukung terlaksananya analisa molekuler dalam penelitian ini.
5. Laboratorium Uji Beton Program Profesional Teknik Infrastruktur ITS yang memfasilitasi pembuatan spesimen beton.
6. Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi ITS yang telah memfasilitasi penggunaan bahan kimia dan alat instrumen dalam penelitian ini.
7. Serta semua pihak yang mendukung lancarnya pelaksanaan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran yang membangun sangat berarti bagi penulis. Penulis berharap semoga Tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca. Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Amin.

Surabaya, 28 Januari 2018

Muhammad Andry Prio Utomo

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	
2.1 Biomineralisasi	5
2.2 Kalsium Karbonat (CaCO_3)	6
2.3 <i>Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation</i> (MICP)	8
2.4 Bakteri	10
2.5 Bakteri Ureolitik Sebagai Penginduksi Presipitasi CaCO_3	11
2.6 Hidrolisis Urea Untuk Energi Pada Bakteri	13
2.7 Enzim Urease	15
2.8 Genetika Molekuler Produksi Urease Bakteri	16
2.9 Faktor yang Mempengaruhi MICP	17
2.10 Bioteknologi Mikroorganisme Pada Teknologi Konstruksi	19
2.11 Manfaat Bioteknologi Mikroorganisme Pada Sifat Beton	20
2.12 Mekanisme Remediasi Beton Dengan Menggunakan Bakteri	21
2.13 Identifikasi Bakteri Menggunakan 16S rRNA	23
BAB III METODA PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
3.2 Metode yang Digunakan	25
3.2.1 Isolasi bakteri karbonatogenik	25
3.2.2 Karakterisasi fenotip	26
3.2.3 Produksi kristal CaCO_3	28
3.2.4 Karakterisasi Kristal CaCO_3	29

3.2.4.1 <i>X-Ray Diffraction</i> (XRD)	29
3.2.4.2 <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM)	29
3.2.5 Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri	30
3.2.5.1 Isolasi DNA genom bakteri	30
3.2.5.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> Gen 16S rRNA	30
3.2.5.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> Gen <i>ureC</i>	31
3.2.5.4 <i>Agarose Gel Electrophoresis</i>	32
3.2.5.5 Purifikasi Produk PCR	32
3.2.5.6 Sekuensing gen 16S rRNA dan <i>ureC</i>	33
3.2.5.7 Rekonstruksi Pohon Filogenetik Spesies	33
3.2.5.8 Penentuan Sekuen Asam Amino Gen <i>ureC</i>	33
3.2.6 Aplikasi Bakteri Sebagai Biofiller.....	34
3.2.6.1 Produksi Mortar	34
3.2.6.2 Aplikasi Biofiller Pada Mortar	34
3.3 Rancangan Penelitian	35
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Isolasi dan Karakterisasi Fenotif Isolat	37
4.2 Pertumbuhan dan Produksi CaCO ₃	37
4.2.1 Kurva Pertumbuhan Isolat	37
4.2.2 Produksi kristal CaCO ₃	38
4.3 Karakterisasi Kristal CaCO ₃	38
4.3.1 Analisa XRD	39
4.3.2 Analisa SEM	39
4.4 Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri	39
4.4.1 Ekstraksi DNA Genom	39
4.4.2 PCR Gen 16S rRNA	40
4.4.3 Analisa BLAST Pada GeneBank	40
4.4.4 Rekonstuksi Pohon Filogenetik Spesies	40
4.5 Gen <i>ureC</i> dan Keanekaragamannya	41
4.5.1 Deteksi Gen <i>ureC</i> dengan PCR	41
4.5.2 Analisa BLASTX di ProteinBank	41
4.6 Aplikasi Biofiller pada Retakan Mortar	41
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	43
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	59

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Jalur Presipitasi Kalsium Karbonat Oleh Bakteri	7
Tabel 3.1 Sekuen primer untuk amplifikasi gen 16S rRNA	31
Tabel 3.2 Sekuen primer untuk amplifikasi gen <i>ureC</i>	31

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi rombohedral kalsit melalui SEM	7
Gambar 2.2 Morfologi aragonit orthorhombic roseta melalui SEM	7
Gambar 2.3 Morfologi vaterite heksagonal melalui SEM	8
Gambar 2.4 Struktur sel bakteri	11
Gambar 2.5 Proses sekresi karbonat dan presipitasi CaCO_3 oleh bakteri	13
Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan ATP melalui proses hidrolisis urea	14
Gambar 2.7 Diagram pita $(\alpha\beta\gamma)_3$ urease <i>Bacillus pasteurii</i>	16
Gambar 2.8 Model aktivasi urease oleh protein aksesori	17
Gambar 2.9 Bakteri untuk perbaikan retakan pada beton	23
Gambar 2.10 Struktur 2D-3D dari gen 16S	24
Gambar 3.1 Ilustrasi dimensi beton dan retakannya untuk aplikasi biosemen	34

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema Kerja	59
Lampiran 2 Komposisi Medium dan Reagen.....	60
Lampiran 3 Ilustrasi Proses Isolasi DNA	62
Lampiran 4 Gambar Koloni Bakteri	63
Lampiran 5 Gambar Karakterisasi Fenotip Bakteri	64
Lampiran 6 Gambar Produksi Kristal CaCO_3	68
Lampiran 7 Data OD Starter dan Berat CaCO_3	69
Lampiran 8 Data Kemurnian DNA dan Sekuen	70
Lampiran 9 Data Tutupan Retakan Mortar	75
Lampiran 10 Matriks Similaritas	76

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan pembangunan infrastruktur di Indonesia berdampak pada penggunaan beton yang semakin meningkat. Beton memiliki beberapa keunggulan yaitu kuat, daya tahan tinggi, mudah dibentuk, tahan terhadap api, dan relatif murah. Retakan kecil (*microcracks*) merupakan salah satu fenomena yang sering terjadi pada struktur beton. Pada retakan tersebut dapat mempermudah masuknya air yang membawa ion klorida (Cl^-) dan gas karbon dioksida (CO_2) yang dapat menyebabkan korosi pada rangka struktur beton.

Teknik yang banyak digunakan untuk menutup retakan beton adalah dengan menggunakan *filler* sintetis, diantaranya menggunakan epoxy resin. Perbaikan dengan menggunakan epoxy resin memiliki kelemahan yaitu adanya perbedaan koefisien panas pemuaian, sehingga dapat terdegradasi seiring dengan bertambahnya waktu, disamping itu membutuhkan pemeliharaan secara kontinyu (De Muynck *et al.*, 2008). Bakteri karbonatogenik dapat menghidrolisis urea secara enzimatis sehingga terbentuk ion karbonat (CO_3^{2-}) (Hammes *et al.*, 2003).

Urease akan menghidrolisis urea dan menghasilkan ion karbonat (CO_3^{2-}) dan amonia (NH_3). Hasil metabolisme tersebut dapat meningkatkan pH dan konsentrasi CO_3^{2-} , sehingga Ca^{2+} dapat terikat dan membentuk kalsium karbonat (CaCO_3) (De Muynck *et al.*, 2010). Kristal CaCO_3 yang mampu dipresipitasi oleh bakteri memiliki tiga fase yaitu kalsit, aragonit, dan vaterit (Thai and Chen, 1998). Metode yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi fase kristal CaCO_3 adalah dengan menggunakan analisa komprehensif XRD dan SEM (Ni *et al.*, 2014). Penelitian Bank *et al.* (2010), dengan menggunakan XRD dan SEM berhasil menemukan fase kalsit, aragonit, dan vaterit dari sampel CaCO_3 yang mampu dipresipitasi oleh bakteri pada lingkungan goa berkapur.

Bakteri karbonatogenik banyak ditemukan di daerah pegunungan dan goa berkapur (Jimenez-Lopez *et al.*, 2008). Jenis bakteri karbonatogenik dari daerah yang banyak diaplikasikan untuk perbaikan beton adalah *Sporosarcina pasteurii* (Whiffin *et al.*, 2007; Sarada *et al.*, 2009), *Bacillus megaterium* (Siddique *et al.*, 2008; Soon *et al.*, 2013; Dhami *et al.*, 2014), *Bacillus cohnii* (Jonkers dan Schlangen, 2008), *Bacillus sphaericus* (Parmar *et al.*, 2013; De Belie dan Muynck, 2009), *Bacillus licheniformis* (Krisnapriya *et al.*, 2015; Vahabi *et al.*, 2013), *Bacillus flexus* (Krisnapriya *et al.*, 2015) dan *Bacillus* sp. (Rukmana dan Zulaika, 2017). Bakteri penghasil CaCO_3 banyak digunakan sebagai agen perbaikan struktur beton karena bakteri tersebut mampu menghasilkan CaCO_3 , tahan terhadap kadar urea dan kalsium yang tinggi, bersifat moderat alkalifil atau alkalifil karena permukaan beton memiliki nilai pH alkali >9 (Li dan Qiu, 2015). Beberapa jenis teknik yang digunakan untuk aplikasi biobeton adalah dengan memasukkan sel bakteri secara langsung pada adonan beton (Krisnapriya *et al.*, 2015; Rukmana dan Zulaika, 2017), aplikasi dengan menggunakan sel bakteri yang dienkapsulasi dalam struktur beton (Wang *et al.*, 2014a; Jonkers *et al.*, 2010), aplikasi bakteri yang terenkapsulasi untuk biofiller permukaan retakan beton (Wang *et al.*, 2014b), aplikasi sel bebas langsung ke permukaan retakan beton (Sharma *et al.*, 2017), dan perendaman spesimen beton menggunakan suspensi bakteri (Wiktor and Jonker, 2011).

Identifikasi bakteri karbonatogenik merupakan proses membandingkan sekuen nukleotida bakteri atau karakter biokimia isolat bakteri yang didapatkan dengan bakteri yang telah teridentifikasi sebelumnya. Identifikasi secara molekuler dapat dilakukan dengan menggunakan sekuen gen 16S rRNA (Dancourt *et al.*, 2000), *gyrA*, *gyrB*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD* (Glazunova *et al.*, 2009). Diantara gen marka tersebut gen 16S rRNA merupakan gen yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri karena terdapat daerah dengan sekuen yang beranekaragam yang mencerminkan sekuen spesifik spesies bakteri (Srinivasan *et al.*, 2015; Conlan *et al.*, 2012; Fetweiss *et al.*, 2012), sehingga banyak penelitian tentang identifikasi spesies bakteri karbonatogenik dilakukan dengan menggunakan sekuen 16S rRNA.

Teknik identifikasi ini memiliki kekurangan yaitu memerlukan data dukungan sifat fenotipik apabila dijumpai kemiripan >97% pada lebih dari satu spesies (Prakash *et al.*, 2007), sehingga perlu dilakukan identifikasi melalui pendekatan taksonomi polifasik dengan menggunakan data sekuen nukleotida gen 16S rRNA dan karakter fenotip serta uji biokimia untuk mendapatkan nama spesies suatu bakteri (Das *et al.*, 2014).

Urease yang dihasilkan oleh bakteri karbonatogenik dikode oleh operon *ure* yang terdiri dari gen *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureD*, *ureE*, *ureF*, dan *ureG* (Hausinger *et al.*, 2004). Bagian fungsional terbesar enzim urease (subunit α) dikode oleh gen *ureC* yang sekuen asam aminonya bervariasi antara bakteri satu dengan lainnya (Mobley *et al.*, 1995). Variasi pada sekuen nukleotida *ureC* dapat digunakan untuk menentukan keanekaragaman bakteri pembentuk kalsium karbonat yang mayoritas menghasilkan urease (Hammes *et al.*, 2003). Berdasarkan urutan sekuen gen *ureC* akan dapat ditentukan nama protein yang disusun oleh asam amino yang dikode oleh gen *ureC*, sehingga dapat diketahui apakah isolat yang teridentifikasi tersebut menghasilkan urease sub-unit α atau bukan.

1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah isolat yang terdeteksi sebagai bakteri karbonatogenik dapat menghasilkan kristal CaCO_3 ?
2. Bagaimanakah karakter kristal CaCO_3 yang dihasilkan oleh bakteri karbonatogenik?
3. Menentukan nama bakteri karbonatogenik sesuai kaidah taksonomi menggunakan marka gen 16S rRNA.
4. Menentukan sekuen asam amino ureC berdasarkan nukleotida gen *ureC*.
5. Apakah isolat yang teridentifikasi memiliki potensi sebagai agen biosemen untuk perbaikan retakan beton.

1.3 Batasan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini dibatasi pada :

1. Karakterisasi kristal CaCO_3 dianalisis dengan XRD (*X-Ray Diffraction*) dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)
2. Penentuan nama spesies menggunakan metode *sequencing* dengan marka gen 16S rRNA.
3. Pohon filogenetik spesies direkonstruksi dengan menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan pengulangan bootstrap 1000 kali.
4. Program yang digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik spesies dan gen menggunakan MEGA 7.
5. Matriks similaritas antar sekuen pada filogenetik spesies dianalisis menggunakan PhyDit.
6. Sekuen *deduced amino acid* ureC didapatkan dari BLASTX NCBI.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendapatkan isolat bakteri karbonatogenik yang mampu membentuk kristal CaCO_3 .
2. Menentukan fase kristal CaCO_3 yang dibentuk oleh bakteri karbonatogenik.
3. Mendapatkan nama spesies bakteri yang dapat dipertanggungjawabkan dan diakui secara internasional.
4. Mendapatkan isolat bakteri karbonatogenik yang dapat dijadikan agen biosemen.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mendapatkan isolat bakteri yang dapat digunakan sebagai *biofiller* yang merupakan alternatif pengganti filler sintetik dan dapat diaplikasikan secara langsung pada retakan beton.

BAB 2

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1. Biomineralisasi

Biomineralisasi merupakan proses yang dilakukan oleh organisme hidup yang dapat mempengaruhi presipitasi material mineral. Proses biomineralisasi membentuk akumulasi heterogen yaitu campuran yang terdiri dari senyawa organik dan inorganik, dengan distribusi yang tidak sama yang mencerminkan lingkungan organisme tersebut berasal (Skinner dan Ehrlich, 2014). Protein spesifik yang terdapat pada substansi polimer ekstraseluler menyebabkan perbedaan bentuk kristal kalsium karbonat yang dihasilkan (Kawaguchi dan Decho, 1999). Proses mineralisasi yang melibatkan organisme eukariot dan prokariot adalah:

- Organisme eukariot: seperti tumbuhan yang memproduksi inklusi sistolit pada daun dan pada hewan adalah pembentukan tulang, gigi, dan cangkang.
- Organisme prokariot: seperti bakteri yang memiliki kemampuan mempresipitasi mineral seperti kalsit, karbonat, fosfat, oksida, sulfida, silikat, perak, dan emas.

Menurut Konhauser (2007), proses biomineralisasi dapat terjadi melalui dua cara yang berbeda yaitu biomineralisasi yang diinduksi secara biologis dan biomineralisasi yang dikontrol secara biologis. Biomineralisasi yang diinduksi secara biologis merupakan proses presipitasi mineral di lingkungan terbuka tanpa kontrol yang jelas oleh sel atas produk mineral yang dihasilkan. Mineral yang dihasilkan biomineralisasi yang diinduksi secara biologis merupakan hasil dari aktivitas metabolisme sel atau melalui interaksi antara metabolisme sel dengan lingkungan disekitarnya. Proses sederhana seperti pengeluaran sisa metabolisme (O_2 , OH^- , HCO_3^- , Fe^{2+} , NH_4^+ , H_2S), perubahan redoks yang dimediasi oleh enzim (oksidasi Fe (II) atau Mn (II)) atau perubahan muatan pada permukaan sel dapat menginduksi nukleasi mineral amorf menjadi mineral kristalin dengan morfologi dan komposisi kimia yang mirip dengan mineral yang dihasilkan oleh presipitasi dari larutan steril (Lowenstam,

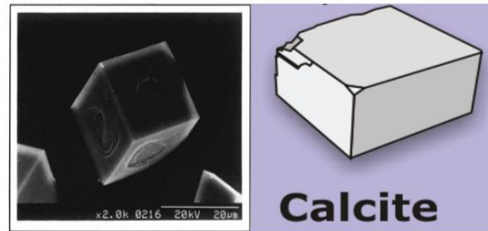
1981). Pada biomineralisasi yang dikontrol secara biologis, organisme memberikan kontrol pembentukan kristalokimia yang besar melalui nukleasi dan pertumbuhan partikel mineral. Mineral akan langsung disintesis pada lokasi yang spesifik di dalam sel atau permukaan sel pada kondisi yang sesuai. Partikel mineral yang diproduksi oleh bakteri pada biomineralisasi yang dikontrol secara biologis memiliki karakter yaitu memiliki kristal yang bentuknya teratur dengan ukuran yang hampir sama, dan morfologi partikelnya konsisten. Karena sifat ini proses biomineralisasi terjadi dibawah kondisi biokimia/ kimia yang spesifik dan kontrol genetik. Contoh biomineralisasi yang dikontrol secara biologis adalah pembentukan magnetosom oleh bakteri magnetotaktik (Bazylinski dan Frankel, 2003). Namun produksi kalsium karbonat (CaCO_3) oleh bakteri merupakan proses biomineralisasi yang diinduksi secara biologis karena jenis mineral yang diproduksi sangat tergantung dari kondisi ion di lingkungan (Rivadeneyra *et al.*, 1994) dan tidak ada struktur yang terspesialisasi atau mekanisme molekuler spesifik (Barabesi *et al.*, 2007).

2.2 Kalsium Karbonat (CaCO_3)

Kalsium karbonat merupakan mineral paling melimpah dan bersifat penting dalam banyak bidang, termasuk pertukaran CO_2 secara global, interaksi yang kuat antara permukaan dengan logam berat di lingkungan, pembentukan sisik, penyimpanan energi, dan material penyusun cangkang dan rangka (De Leeuw dan Parker, 1998). Kalsium karbonat bernukleasi dalam tiga bentuk berbeda dari larutan cair, seperti kalsit, aragonit, dan vaterit tergantung dari kondisi lingkungan (Tai dan Chen, 1998). Perbedaan antara bentuk kalsit, aragonit, dan vaterit adalah sebagai berikut:

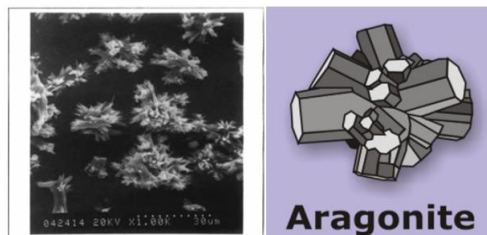
- Kalsit: Kalsit merupakan bentuk kalsium karbonat yang paling stabil terhadap suhu dan tekanan (Falini *et al.*, 1996). Kalsit memiliki bentuk rhombohedral dan merupakan mineral yang penting untuk lingkungan. Kalsit berperan sebagai pembentuk bagian inorganik paling penting dari kerang, dan disekresikan oleh beberapa organisme, seperti karang untuk membentuk rangka yang solid (Skinner *et*

al., 1994). Pembentukan kalsit dipengaruhi oleh ion magnesium (De Choudens-Sanchez dan Gonzalez, 2009). Morfologi kalsit terdapat dalam Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi rombohedral kalsit melalui SEM (Tai dan Chen, 1998).

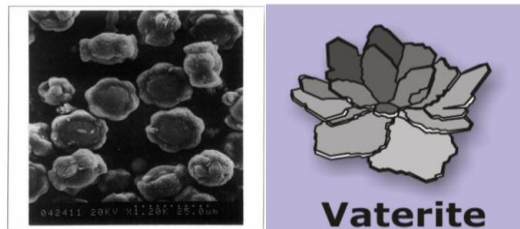
- Aragonit: merupakan salah bentuk polimorfisme orthorhombic dari kalsium karbonat yang bersifat metastabil pada temperatur rendah dan dalam tekanan atmosfer. Aragonit dapat berubah menjadi kalsit apabila dipanaskan (Peric *et al.*, 1996). Kristal orthorhombic dihasilkan pada temperatur yang tinggi atau pada temperatur rendah dengan kehadiran ion magnesium, dan pH kurang dari 11, pembentukannya dipengaruhi oleh ion magnesium dan mangan (Tai dan Chen, 1998). Morfologi orthorhombic dari aragonit terdapat dalam Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Morfologi aragonit orthorhombic roseta melalui SEM (Tai dan Chen, 1998).

- Vaterite: merupakan kristal modifikasi dalam bentuk heksagonal dari kalsium karbonat (Peric *et al.*, 1996). Struktur vaterite relatif tidak stabil, yang terbentuk pada suhu yang tinggi, dan sangat mudah berubah menjadi bentuk kalsit di semua temperatur (Maciejewski *et al.*, 1994). Tiga bentuk kristal vaterit yang diketahui: spherulite (pada pH 9.3 pada temperatur ruangan), heksagonal (pada pH 9.6), dan

lembaran menyerupai daun selada (pada pH 8.5 dan temperatur 40°C) (Tai dan Chen, 1998).



Gambar 2.3 Morfologi vaterite heksagonal melalui SEM (Tai dan Chen, 1998).

2.3 *Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP)*

Microbial induced calcium carbonate precipitation (MICP) adalah proses biogeokimia yang menginduksi presipitasi kalsium karbonat di dalam matriks tanah. Mineral yang terpresipitasi mengikat butiran pasir melalui kontak permukaan antar partikel yang dapat meningkatkan kekuatan dan kekakuan tanah (Mortensen *et al.*, 2011). Presipitasi kalsium karbonat merupakan kombinasi dari beberapa proses, termasuk mineralisasi pada permukaan sel mikroba, presipitasi kimia dari larutan jenuh, dan erosi dari lapisan karbonat yang sudah eksis (Riding, 2000). Selama MICP, organisme mampu mensekresikan produk metabolisme seperti karbonat (CO_3^{2-}) yang akan bereaksi dengan ion kalsium (Ca^{2+}) pada lingkungan menghasilkan presipitasi mineral kalsium karbonat (Anbu *et al.*, 2016). Bakteri autotrof dan heterotrof mampu mempresipitasikan kalsium karbonat di lingkungan.

Menurut Castaner *et al.* (1999), bakteri autotrof dapat menginduksi proses presipitasi kalsium karbonat melalui 3 mekanisme yaitu metanogenesis non-metilotrofik oleh archaeobakteria metanogenik, fotosintesis anoksigenik oleh sulfur – non-sulfur bakteri fotosintetik hijau atau ungu, dan fotosintetik oksigenik oleh *cyanobacteria*. Bakteri-bakteri tersebut mensintesis karbon organik dari CO_2 terlarut yang berasal dari atmosfer, respirasi organisme prokariot dan eukariot, atau fermentasi. Jalur heterotrof lebih beragam di alam, presipitasi karbonat merupakan respon komunitas mikroba heterotrof terhadap bahan organik di lingkungan (Castaner *et al.*, 1999). Jalur heterotrof pertama berkaitan dengan siklus sulfur yaitu

reduksi sulfat yang dilakukan oleh bakteri pereduksi sulfat dibawah kondisi anoksik. Jalur heterotrof yang kedua berkaitan dengan siklus nitrogen yaitu: (1) deaminasi asam amino oksidatif dalam kondisi aerob, (2) reduksi nitrat dalam kondisi anaerob atau mikroaerofil, dan (3) degradasi urea atau asam urat dalam kondisi aerob. Proses lainnya yang dilakukan mikroba yang dapat meningkatkan pH dan kadar karbon inorganik terlarut adalah penggunaan asam organik (Braissant *et al.*, 2002). Selain itu partikel karbonat juga dapat dihasilkan oleh pertukaran ion melalui membran sel (Castanier *et al.*, 1999). Namun, presipitasi kalsium karbonat oleh bakteri melalui proses hidrolisis urea merupakan metode yang paling banyak digunakan (De Jong *et al.*, 2010). Beberapa jalur metabolisme bakteri yang mempengaruhi presipitasi kalsium karbonat tersaji dalam Tabel 2.1.

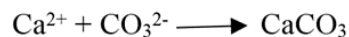
Tabel 2.1 Jalur presipitasi kalsium karbonat oleh bakteri.

Bakteri Autotrof	Bakteri Heterotrof	
Methanogenesis non-metilotropik	Siklus nitrogen	Aminofikasi asam amino
		Reduksi nitrat
Fotosintesis Anoksigenik		Degradasi urea dan asam urat
	Siklus sulfur	Reduksi sulfat
Fotosintesis Oksigenik	Penggunaan karbon organik	

Sumber: Wang *et al.*, 2016.

Selain menginduksi perubahan pada lingkungan makro, bakteri dilaporkan mampu mempengaruhi proses presipitasi kalsium karbonat dengan berperan sebagai titik nukleasi atau pertumbuhan kalsium karbonat (Morita, 1980). Dinding sel bakteri memiliki beberapa gugus kimia yang bermuatan negatif, ion kalsium yang bermuatan

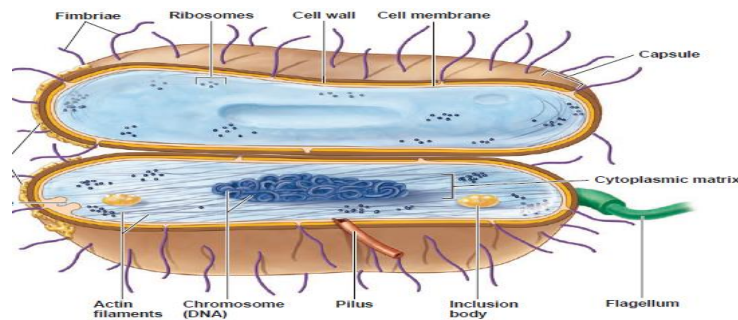
positif akan terikat pada permukaan sel bakteri. Ion kalsium yang terikat akan bereaksi dengan ion karbonat untuk membentuk kalsium karbonat yang merupakan garam tidak terlarut. Apabila terdapat ion kalsium dan ion karbonat dalam jumlah yang cukup, garam logam pada permukaan sel bakteri menginisiasi pembentukan mineral yang berperan sebagai titik nukleasi. Ion karbonat dalam reaksi ini merupakan hasil dari metabolisme bakteri (Ehrlich, 1998). Reaksi pembentukan garam kalsium karbonat adalah sebagai berikut:



2.4 Bakteri

Kingdom Monera dapat juga disebut dengan kingdom Prokariot diusulkan oleh seorang ahli biologi laut berkebangsaan Prancis Edouard Chatton pada tahun 1937. Terdiri dari semua organisme prokariot, termasuk *eubacteria* (bakteri sesungguhnya). Semua monera adalah uniselular, tidak memiliki membran inti, dan pada umumnya tidak memiliki organel bermembran sehingga hanya sedikit dari DNA monera yang dapat berasosiasi dengan organel bermembran. Kingdom monera memiliki cara reproduksi yaitu pembelahan biner. Dari semua anggota monera *eubacteria* adalah yang paling besar menarik perhatian dalam dunia kesehatan (Black dan Black, 2012). Kata bakteri berasal dari bahasa Yunani “*bacterion*” yang berarti batang atau tongkat. Sekarang nama tersebut dipakai untuk menyebut sekelompok mikroorganisme bersel satu, tubuhnya bersifat prokariotik. Bakteri berkembang biak dengan cara membelah diri (ciri dari kingdom Monera), dan karena ukurannya yang begitu kecil maka hanya dapat dilihat hanya dengan menggunakan mikroskop. Bakteri walaupun bersel satu tetapi mempunyai beberapa organel yang dapat untuk melaksanakan beberapa fungsi hidup (Waluyo, 2007). Bakteri merupakan anggota dari prokariot yang berukuran mikroskopis dan memiliki peptidoglikan sebagai bahan dasar penyusun dinding selnya (Madigan *et al.*, 2012). Meskipun archaea dan bakteri terlihat sama, tetapi komposisi bahan kimianya berbeda. Ribuan spesies bakteri ditentukan oleh banyak faktor, termasuk morfologi, komposisi kimia, kebutuhan

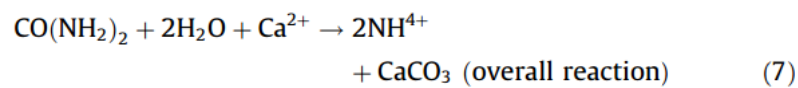
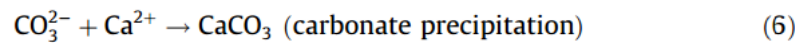
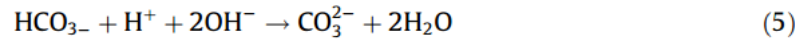
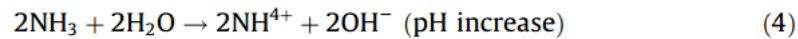
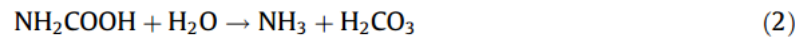
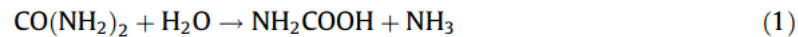
nutrien, aktivitas biokimia, dan sumber energinya. Dapat diestimasikan bahwa 99% bakteri di alam hidup dalam biofilm (Tortora *et al.*, 2012).



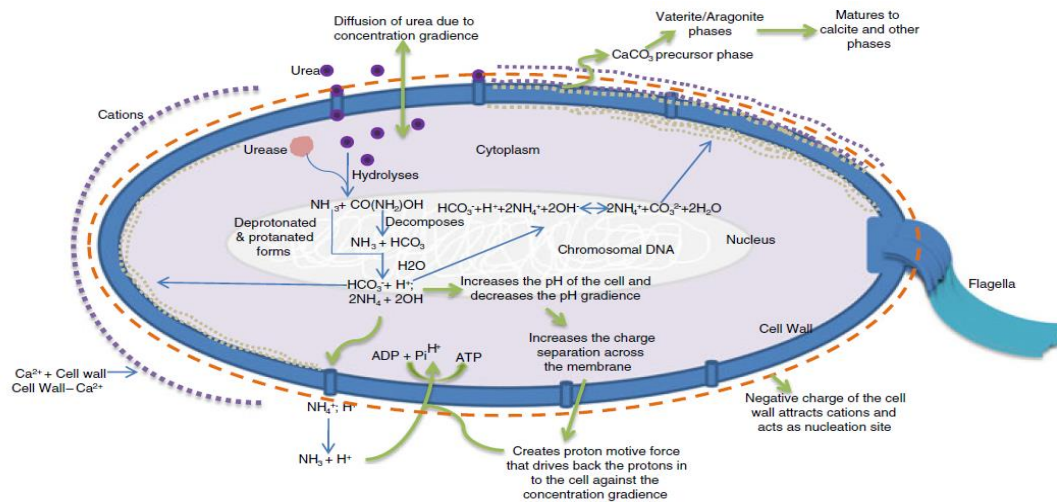
Gambar 2.4 Struktur Sel Bakteri (Talaro, 2008).

2.5 Bakteri Ureolitik Sebagai Penginduksi Presipitasi CaCO_3

Degradasi urea atau ureolisis oleh bakteri (hidrolisis urea secara enzimatik) telah banyak diteliti untuk presipitasi kalsium karbonat karena pada proses ini lebih mudah dikontrol dan produk kalsium karbonat yang dihasilkan lebih dipertimbangkan untuk aplikasi di lapangan. Urea akan didekomposisi oleh bakteri dengan menggunakan enzim urease yang akan menghasilkan amonium (NH_4^+), karbon inorganik terlarut (DIC), dan meningkatkan pH lingkungan (De Belie dan Wang, 2015). Ketika reaksi hidrolisis urea berlangsung pada lingkungan yang kaya dengan kalsium, kalsium karbonat (CaCO_3) akan terpresipitasi dari larutan dan membentuk material kristal padat (Siddique dan Chahal, 2011). Laju reaksi hidrolisis urea yang dikatalis enzim urease bakteri 10^{14} kali lebih cepat daripada yang tidak dikatalis. Berikut reaksi lengkap hidrolisis urea yang dapat mempresipitasi kalsium karbonat:



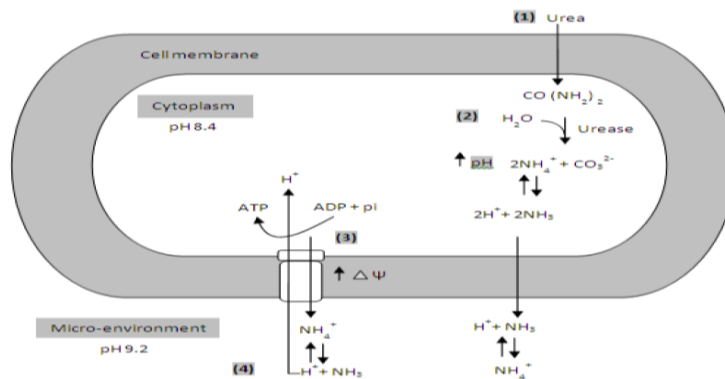
Satu mol urea akan dihidrolisis secara intraseluler menghasilkan 1 mol ammonia dan 1 mol karbamat (Reaksi 1), yang akan secara spontan terhidrolisis membentuk 1 mol ammonia tambahan dan asam karbonik (Reaksi 2). Produk ini selanjutnya akan membentuk ion bikarbonat di dalam air, 2 mol ammonium, dan 2 mol hidroksida (Reaksi 3 dan 4). Ammonium yang dihasilkan akan meningkatkan pH lingkungan, sehingga ion bikarbonat dapat membentuk ion karbonat (Reaksi 5). Apabila terdapat ion kalsium di lingkungan, maka ion karbonat dan ion kalsium akan saling berikatan dan membentuk presipitat kalsium karbonat (CaCO_3) (Reaksi 6). Reaksi 7 menunjukkan keseluruhan reaksi di dalam sistem, menunjukkan bahwa apabila ditambahkan urea dan kalsium dalam sistem, maka akan menghasilkan ammonium dan kalsium karbonat (Siddique dan Chahal, 2011). Proses presipitasi kalsium karbonat (CaCO_3) oleh bakteri terdapat dalam Gambar 2.4.



Gambar 2.5 Proses sekresi karbonat dan presipitasi CaCO_3 oleh bakteri (Sarayu *et al.*, 2013).

2.6 Hidrolisis Urea Untuk Energi Pada Bakteri

Urea dihidrolisis bakteri untuk menghasilkan energi dan sebagai sumber nitrogen (Chahal *et al.*, 2011). Contohnya bakteri *Sporosarcina pasteurii*, ATP yang dihasilkan berhubungan dengan hidrolisis urea dan produksi ion ammonium (NH_4^+). *Proton motive force* (potensial elektrokimia) mengontrol pembentukan ATP. Sistem pembentukan ATP berhubungan dengan produk ammonium yang dihasilkan selama hidrolisis urea. Mekanismenya adalah sebagai berikut: (1) Urea dapat masuk ke dalam sel bakteri karena gradien konsentrasi; (2) Hidrolisis urea menghasilkan peningkatan pH di dalam sitoplasma ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) menimbulkan gradient pH; (3) Ammonium berdifusi keluar sel karena gradient konsentrasi, menghasilkan peningkatan potensial membran; (4) Peningkatan potensial membran mempengaruhi proton untuk masuk kembali ke dalam sel dengan melawan gradien konsentrasi (Al-Thawadi, 2011).



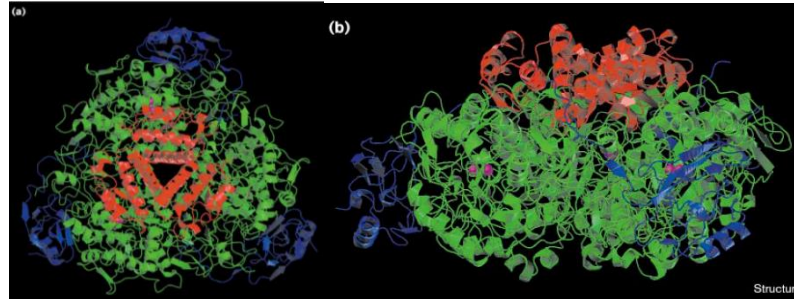
Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan ATP melalui proses hidrolisis urea (Al-Thawadi, 2011).

Pada bakteri alkalifil (bakteri yang mampu tumbuh optimal pada kondisi pH tinggi), kondisi untuk menghasilkan ATP berbeda dengan bakteri neutrofil. Bakteri neutrofil akan mengeluarkan proton melalui mekanisme rantai transport elektron, menyebabkan kenaikan konsentrasi proton di lingkungan (konsentrasi proton di dalam sel lebih rendah jika dibandingkan dengan di luar sel). Proton kemudian masuk kembali ke dalam sel bakteri berdasarkan gradien konsentrasi melalui ATP sintase, sehingga menghasilkan ATP (Prescott *et al.*, 1993). Sedangkan pada mikroorganisme alkalifil, pH diluar sel lebih tinggi (konsentrasi proton rendah), sehingga proton akan berdifusi keluar dari dalam sel karena terdapat gradien konsentrasi (konsentrasi proton di dalam sel lebih tinggi daripada diluar sel). Untuk mengatasi hal ini, bakteri alkalifil mengembangkan dua mekanisme untuk mendorong proton kembali ke dalam sel supaya menghasilkan ATP. Kedua mekanisme ini adalah meningkatkan pH di dalam sel menyebabkan sitoplasma bersifat alkali (mereduksi gradien pH), dan meningkatkan potensial membran dengan mengeluarkan kation NH_4^+ lebih banyak daripada H^+ . Karena meningkatnya potensial membran, *proton motive force* mendorong kembali proton masuk ke dalam sel dengan melawan gradien konsentrasi (Al-Thawadi, 2011).

2.7 Enzim Urease

Urease merupakan metaloenzim yang kerjanya membutuhkan nikel untuk mengkatalis hidrolisis urea dan menghasilkan ammonia dan karbamat, yang selanjutnya akan terhidrolisis secara spontan membentuk asam karbonik dan molekul ammonia lainnya (Andrews *et al.*, 1984). Enzim urease dapat ditemukan pada bakteri, jamur, dan tanaman tingkat tinggi. Meskipun didapatkan dari sumber yang berbeda enzim urease memiliki sekuen asam amino, struktur, dan mekanisme katalitik yang sama (Karplus *et al.*, 1997). Enzim urease pada tanaman dan jamur merupakan protein homooligomerik, sedangkan urease pada bakteri merupakan protein multimerik yang terdiri dari dua atau tiga subunit (Mobley *et al.*, 1995). Enzim urease dimanfaatkan oleh organisme untuk mendapatkan nitrogen dan energi dari lingkungan (Al-Thawadi, 2011).

Beberapa urease dari bakteri yang memiliki peranan penting dalam patogenitas pada manusia atau hewan berasal dari beberapa spesies bakteri yaitu *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Ureaplasma urealiticum*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella aerogenes* (Mobley *et al.*, 1995). Beberapa bakteri seperti alkalifil seperti *S. pasteurii*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium* mampu menghasilkan urease untuk mempresipitasi mineral karbonat. *Sporosarcina pasteurii* merupakan bakteri yang tersebar luas di tanah dan menarik perhatian karena mampu menghasilkan urease dalam jumlah yang besar. Urease dari *S. pasteurii* yang telah berhasil dimurnikan dan dikristalisasi merupakan protein heteropolimer ($\alpha\beta\gamma$)₃ yang terdiri dari tiga rantai polipeptida dengan berat molekul berbeda (α = 61,4 kDa, β = 14,0 kDa, γ = 11,1 kDa) dengan sisi aktif memiliki dua ion nikel yang diikat oleh tiga sampai empat asam amino (Benini *et al.*, 1999). Diagram pita bentuk protein heterotrimer dari urease *Bacillus pasteurii* (*S. pasteurii*) ditunjukkan dalam Gambar 2.7.



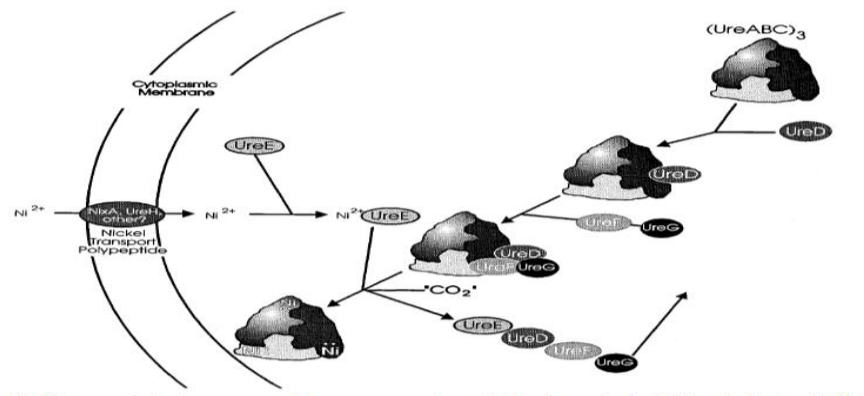
Gambar 2.7 Diagram pita $(\alpha\beta\gamma)_3$ urease *Bacillus pasteurii*. (a) Penampakan dari atas dan (b) Penampakan dari samping (Warna hijau mewakili subunit α , biru mewakili subunit beta β , dan merah mewakili subunit γ) (Benini *et al.*, 1999).

2.8 Genetika Molekuler Produksi Urease Mikroba

Urease merupakan enzim yang mengandung nikel dan membutuhkan aktivitas protein tambahan untuk mendapatkan kemampuan hidrolisisnya. Proses ini melibatkan gen yang mengkode polipeptida struktural pada enzim dan gen yang mengkode protein aksesori terletak pada kluster yang sama (Mobley *et al.*, 1995). Urease pada bakteri selalu terdiri dari protein multimerik yang terdiri dari dua sampai tiga polipeptida berbeda. Pada *P. mirabilis* terdapat tiga struktur subunit yaitu 11 kDa UreA (subunit γ), 12.2 kDa UreB (subunit β), dan 61 kDa UreC (subunit α) yang dikode oleh tiga gen struktural ureA, ureB, dan ureC (Moobley *et al.*, 1995; Joners dan Mobley, 1989). Pusat sisi aktif dari enzim terdiri dari dua ion nikel yang terletak pada subunit struktural paling besar yang dikode oleh gen *ureC* (Mobley *et al.*, 1995). Gen pengkode urease terdapat dalam plasmid bakteri (Rasko *et al.*, 2004).

Semua urease bakteri awalnya terdapat dalam bentuk apoenzim inaktif yang terdiri dari dua sampai tiga polipeptida yang dikode oleh gen struktural spesifik. Namun, protein tambahan, produk dari gen aksesori dibutuhkan untuk aktivasi urease. Protein UreD, UreE, UreF, UreG, dan UreH terlibat dalam transport ion nikel ke dalam sel yang berhubungan dengan pusat sisi aktif apoenzim. Apoenzim urease dibentuk dari tiga kopi subunit polipeptida berbeda, UreA, UreB, dan UreC menghasilkan $(UreABC)_3$. Aktivasi secara *in vivo* apoprotein membutuhkan kehadiran ion nikel, karbon dioksida, dan beberapa protein yang dikode gen urease

aksesori. UreD berperan sebagai protein mirip kaperon, akan membentuk kompleks dengan apoenzim. UreF dan UreG akan bergabung dengan kompleks menjadikan apoenzim kompeten untuk menerima ion Nikel (Ni^{2+}) pada sisi aktifnya. Protein ini berfungsi dalam pengiriman atau produksi molekul karbon dioksida yang dibutuhkan yang bereaksi dengan apoprotein menjadi ligan untuk nikel. Sebagai alternatifnya, UreF atau UreG memfasilitasi interaksi antara apoprotein urease dan donor ion nikel UreE. Hal ini memungkinkan protein ini mampu mengeluarkan ion metal non-produktif yang terikat pada sisi aktif enzim. Setelah teraktivasi UreD, UreE, UreF, dan UreG terdisosiasi dari enzim dan dapat digunakan ulang untuk interaksi dengan molekul apoenzim selanjutnya (Mobley *et al.*, 1995). Gambar model aktivasi urease oleh gen aksesori terdapat dalam Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Model aktivasi urease oleh protein aksesori (Mobley *et al.*, 1995).

2.9 Faktor Yang Mempengaruhi MICP

Aktivitas urease dan jumlah kalsium karbonat terpresipitasi berdasarkan pada beberapa faktor. Faktor yang paling berpengaruh terhadap aktivitas urease dan presipitasi kalsium karbonat adalah nutrisi, jenis bakteri, konsentrasi sel bakteri, suhu dan pH, dan konsentrasi reaktan.

2.9.1 Nutrisi

Nutrisi merupakan sumber energi untuk bakteri karena itu menyediakan nutrisi yang tepat dengan jumlah yang cukup merupakan faktor yang penting untuk mendukung pertumbuhan bakteri yang memproduksi kalsit. Penambahan 3 gram

nutrient broth dalam satu liter larutan dapat mendukung pertumbuhan dan viabilitas mikroba penghasil enzim urease di dalam spesimen tanah (De Jong *et al.*, 2006).

2.9.2 Jenis Bakteri

Jenis bakteri yang cocok untuk aplikasi MICP adalah harus mampu menghidrolisis urea dan biasanya berasal dari bakteri penghasil enzim urease. Contoh bakteri yang diketahui memiliki enzim urease berasal dari genus *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, dan *Desulfotomaculum* (Kucharski dan Wyszowska, 2008). *Bacillus* sp. merupakan genus bakteri yang telah umum digunakan untuk presipitasi kalsium karbonat dalam lingkungan mikro mereka melalui konversi urea menjadi ammonia dan karbon dioksida. Contohnya adalah *Bacillus cohnii* yang mampu menginduksi presipitasi kalsium karbonat (CaCO_3) yang dimanfaatkan untuk *healing* pada beton (Jonkers dan Schlangen, 2008).

2.9.3 Konsentrasi Sel Bakteri

Konsentrasi bakteri yang lebih tinggi yang diinokulasikan ke dalam sampel tanah akan meningkatkan jumlah kalsit terpresipitasi melalui proses MICP (Okwadha dan Li, 2010). Laju hidrolisis urea berbanding lurus dengan konsentrasi sel bakteri. Konsentrasi bakteri yang lebih tinggi memproduksi urease lebih banyak per unit volume untuk dapat menghidrolisis urea. Selain itu bakteri berperan untuk menyediakan titik awal inisiasi pertumbuhan kalsium karbonat, sehingga semakin banyak jumlah sel bakteri maka semakin banyak jumlah kalsium karbonat yang terpresipitasi (Ehrlich, 1998).

2.9.4 Suhu dan pH lingkungan

Presipitasi kalsium karbonat terjadi ketika urea didekomposisi oleh enzim urease. Sama dengan enzim lainnya, urease hanya aktif pada pH tertentu. Menurut Stocks-Fischer *et al.* (1999), kerja enzim urease optimal pada pH 7.5-8.0. Kerja enzim urease meningkat secara cepat dari pH 6.0 ke 8.0. Namun, kerja enzim urease masih tetap stabil pada pH 9.0. Presipitasi kalsium-karbonat kebanyakan terjadi di dalam kondisi pH alkalin dari pH 8.7 hingga 9.5. Seperti pada reaksi enzimatik

lainnya, hidrolisis urea tergantung pada suhu. Suhu optimum untuk aktivitas urease berkisar dari suhu 20°C hingga suhu 37°C (Okwadha dan Li, 2010).

2.9.5 Konsentrasi Reaktan

Konsentrasi urea dan kalsium (Ca^{2+}) akan sangat mempengaruhi presipitasi kalsium karbonat. Urea menyediakan energi dan sumber nitrogen untuk bakteri. Urea juga berperan sebagai sumber ion karbonat (CO_3^{2-}) dalam presipitasi kalsium karbonat CaCO_3 . Namun konsentrasi urea di dalam medium dapat mempengaruhi laju presipitasi kalsium karbonat. Jika konsentrasi urea terlalu tinggi, dan tidak adanya air disekitar molekul urea pada sisi aktif enzim urease maka tidak akan terjadi reaksi hidrolisis. Selain itu konsentrasi ion kalsium (Ca^{2+}) juga mempengaruhi laju presipitasi CaCO_3 . Apabila konsentrasi ion kalsium (Ca^{2+}) semakin tinggi, akan lebih banyak ion kalsium (Ca^{2+}) yang akan terikat pada permukaan sel bakteri yang menghambat difusi urea untuk masuk ke dalam sel sehingga menurunkan laju presipitasi CaCO_3 . Ion kalsium dengan konsentrasi terlalu tinggi maka akan bersifat racun bagi sel bakteri (De Belie dan Wang, 2015).

2.10 Bioteknologi Mikroorganisme Pada Teknologi Konstruksi

Teknologi konstruksi merupakan cabang baru pada bidang bioteknologi mikroorganisme. Terdapat dua arahan utama dalam bidang bioteknologi mikroorganisme untuk teknologi konstruksi yaitu: (1) produksi material konstruksi oleh sel mikroorganisme, dan (2) aplikasi mikroorganisme pada proses konstruksi. Contoh produksi material konstruksi oleh mikroorganisme adalah biosemen. Biosemen dari sel mikroorganisme dapat diproduksi dari batu kapur, dolomit, atau bijih besi pada temperatur 20-60°C dengan energi 10% lebih rendah dari energi yang dibutuhkan untuk memproduksi semen secara konvensional. Oleh karena itu, biaya yang dibutuhkan untuk produksi biosemen lebih rendah dibandingkan produksi semen secara konvensional. Keunggulan penggunaan biosemen mikroba dibandingkan semen konvensional adalah tidak memiliki efek negatif terhadap

lingkungan karena produksinya menggunakan bahan organik dan viskositasnya rendah (Ivanov *et al.*, 2015).

Penggunaan bioteknologi mikroorganisme pada proses konstruksi yang paling banyak digunakan adalah biocoating dan biosementasi. Biocrusting pada permukaan tanah merupakan proses untuk membentuk mineral atau kerak organik pada permukaan tanah sehingga erosi, emisi debu, dan perembesan air dapat direduksi (Chu *et al.*, 2012). Biosementasi lebih mengarah kepada proses untuk meningkatkan kekuatan partikel tanah secara signifikan (Ghosh *et al.*, 2005). Menurut Ivanov *et al.* (2015), aplikasi bioteknologi mikroorganisme dalam proses konstruksi terbagi menjadi tiga tahapan utama yaitu:

- Proses hulu seperti preparasi tanah atau material konstruksi untuk perlakuan, persiapan reagen, perlengkapan, dan inokulum sel mikroba untuk perlakuan.
- Proses inti seperti perlakuan pada tanah, material konstruksi, atau objek konstruksi lainnya.
- Proses hilir seperti disinfeksi pada sisa buangan perlakuan baik yang berbentuk padat, cair, atau gas.

2.11 Manfaat Bioteknologi Mikroorganisme Pada Sifat Beton

- Kuat Tekan

Kuat tekan merupakan prasyarat utama dan terpenting untuk menilai material konstruksi atau struktur, yang ditunjukkan sebagai total beban kompresi utama per area penampang melintang, biasanya dalam satuan psi, Pa, atau Kg/cm^3 . Hal tersebut dibutuhkan untuk menentukan apakah campuran beton yang digunakan dalam konstruksi telah mencapai standar dari kekuatan spesifik suatu material konstruksi atau tidak. Penelitian Ramachandran *et al.* (2001) menunjukkan sel bakteri *S. pasteurii* dan *P. aeruginosa* yang dipeletkan kemudian diaplikasikan dalam retakan mortar menunjukkan peningkatan nilai kuat tekan dari 55 MPa menjadi 65 Mpa setelah perendaman dalam larutan CaCl_2 selama 7 hari. Peningkatan nilai kuat tekan juga ditunjukkan dalam penelitian Achal *et al.* (2010), dimana bakteri *S. pasteurii*

mampu meningkatkan nilai kuat tekan spesimen mortar hingga 37% dibandingkan dengan mortar kontrol (23,2 MPa) setelah inkubasi selama 28 hari.

- Permeabilitas

Permeabilitas merupakan faktor penting dimana daya tahan beton tergantung, diketahui sebagai sifat yang mengatur laju atau aliran cairan pada pori-pori mortar atau beton. Sifat tersebut mengendalikan masuknya uap air, gas, atau zat berbahaya ke struktur beton (Reddy *et al.*, 2012). Aplikasi *B. sphaericus* pada spesimen mortar menunjukkan penurunan signifikan serapan air jika dibandingkan pada spesimen yang tidak diberi perlakuan (reduksi 45, 43, dan 24% dengan meningkatnya w/c) dan 19% penurunan nilai koefisien dari migrasi klorida (De Muynck *et al.*, 2008). Penelitian Achal *et al.* (2011), menunjukkan mortar dengan sel *Bacillus* sp. CT-5 mampu menurunkan nilai serapan air enam kali lebih rendah dibandingkan mortar kontrol dalam 168 jam inkubasi.

- Korosi

Korosi baja dan bar penguat merupakan faktor utama yang menyebabkan deteriorasi lebih awal yang meluas pada konstruksi beton di seluruh dunia (Raupach and Schiebl, 2001). Korosi dan permeabilitas berkorelasi secara langsung, dimana apabila permeabilitas lebih tinggi akan meningkatkan peluang terjadinya korosi. Masuknya cairan, ion klorida, dan karbon dioksida melewati struktur beton dapat menginisiasi proses korosi pada permukaan baja penguat beton. Penelitian Achal *et al.* (2012), menunjukkan spesimen RC dengan sel *Bacillus* sp. CT-5 memiliki nilai *Icorr* lebih rendah (14.78 mA/m² [9.53 mA/in.²] dibandingkan dengan RC kontrol (60.83 mA/m² [39.25 mA/in.²]), sehingga pengaplikasian *Bacillus* sp. CT-5 dapat memperlambat proses terjadinya korosi.

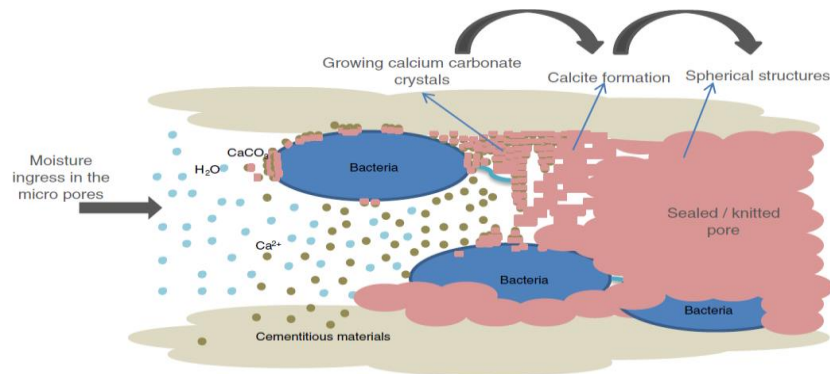
2.12 Mekanisme Remediasi Beton Menggunakan Bakteri

Semen banyak digunakan sebagai material konstruksi untuk memperkuat tanah (Stabnikov *et al.*, 2013). Namun produksi semen menghabiskan total 5% total energi yang dikonsumsi untuk industri dan menimbulkan 5% emisi CO₂ antropogenik

(Worrel *et al.*, 2011). Biosemen merupakan alternatif pengganti semen dan zat kimia yang dapat memproduksi material pengikat melalui mikroba penginduksi presipitasi kalsium karbonat untuk mengikat patahan dan meningkatkan kekuatan dan daya tahan material konstruksi (Philips *et al.*, 2013; Dhami *et al.*, 2014). Biosementasi dari MICP banyak diaplikasikan untuk perbaikan retakan pada beton (Ramachandran *et al.*, 2001)

Ketika retakan terjadi pada beton, dapat menimbulkan terjadinya korosi pada baja di dalam beton yang berangsur-angsur akan merusak struktur beton. Jika tidak segera diatasi, retakan akan menyebarluas dan akan menimbulkan kerusakan lanjutan. Akhir-akhir ini untuk perbaikan retakan pada beton banyak digunakan epoxy, resin, epoxy mortar, dan filler sintetis lainnya. Kebanyakan larutan kimia sintetis ini butuh diaplikasikan lebih dari satu kali, sehingga kurang efektif. Diperlukan metode perbaikan beton yang efektif, jangka panjang, dan ramah lingkungan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengendapan kalsium karbonat oleh bakteri merupakan metode yang efektif untuk memperbaiki retakan dan fisura pada beton (Siddique dan Chahal, 2011).

Ramachandran *et al.* (2001), melakukan penelitian tentang remediasi retakan beton dengan menggunakan bakteri. Spesimen beton dengan retakan buatan diisi dengan bakteri *B. pasteurii*, nutrisi, dan pasir menunjukkan kenaikan signifikan pada kekuatan terhadap tekanan dan kekakuannya dibandingkan dengan spesimen beton tanpa sel bakteri, dari 10 hingga 27% tergantung dari jumlah sel bakteri yang ditambahkan. Pengamatan dengan menggunakan SEM menunjukkan adanya padatan kristal kalsium karbonat (CaCO_3) yang tertanam dengan sel bakteri terbentuk pada daerah dekat dengan permukaan retakan beton. Hal ini dikarenakan *B. pasteurii* bekerja lebih efektif apabila terdapat oksigen. Sehingga penulis menyimpulkan bahwa penggunaan bakteri pempresipitasi karbonat merupakan salah satu metode yang efektif untuk menutup retakan pada beton.



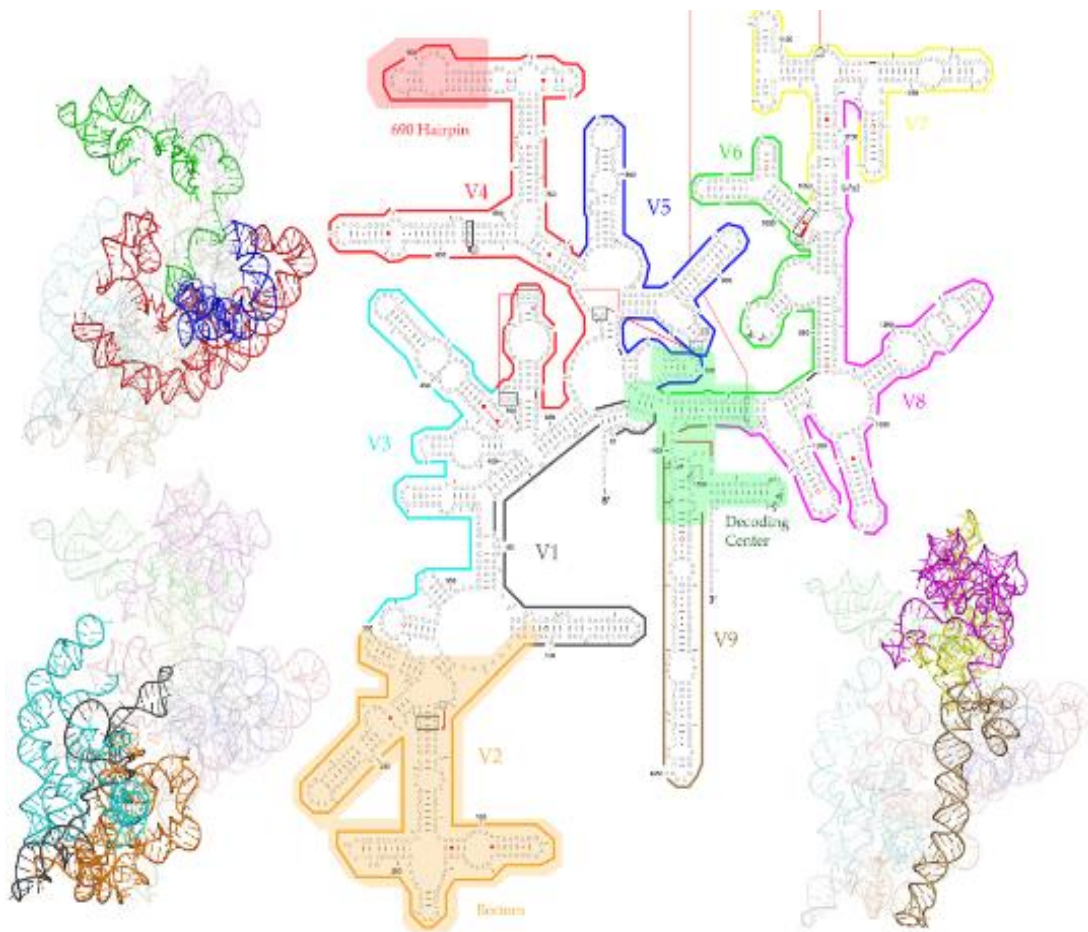
Gambar 2.9 Bakteri untuk perbaikan retakan pada beton (Sarayu *et al.*, 2013).

2.13 Identifikasi Bakteri Menggunakan 16S rRNA

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan mengamati karakter fenotipik berdasarkan sifat fisiologis dan biokimianya di dalam medium tertentu (Lay, 1994). Namun karakterisasi tersebut kurang dapat diandalkan karena banyak memiliki batasan diantaranya hasilnya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan hanya bisa mengkarakterisasi hingga tingkat genus. Metode molekuler terutama klasifikasi dan identifikasi berbasis filogenetik, menggunakan parameter yang tidak bergantung pada kondisi pertumbuhan dan media yang digunakan. Salah satu metode dikembangkan adalah identifikasi berdasarkan ribosomal RNA (Dancourt *et al.*, 2000).

Molekul rRNA sangat khas karena disusun oleh daerah-daerah lestari dan daerah yang bervariasi. Beberapa segmen RNA berevolusi sangat lambat sehingga filogeni dari taksa yang berdekatan dapat dikonstruksi kembali. Bagian lain cukup bervariasi sehingga dapat digunakan untuk menggolongkan isolat bakteri hingga tingkat spesies. Banyaknya posisi pada molekul 16S rRNA dan 23S rRNA yang berevolusi secara bebas menyediakan data untuk menduga hubungan filogenetik sekelompok mikroba. Sifat rRNA sangat lestari memungkinkan untuk mensintesis primer universal untuk proses PCR yang mampu melekat pada sekuen lestari dari gen rRNA pada makhluk hidup. Daerah yang sangat terkonservasi tersebut seringkali digunakan menjadi situs pelekatan primer universal untuk amplifikasi 16S rRNA

secara in-vitro dari DNA template yang diisolasi langsung dari lingkungan (Dancourt *et al.*, 2000). Dasar penggunaan gen 16S rRNA adalah sebagai berikut: (1) bersifat universal karena ikut membangun ribosom yang terlibat dalam proses sintesis protein, (2) sekuen basa-basanya bersifat lestari, (3) jumlahnya melimpah di dalam sel, (4) memiliki ukuran untuk perhitungan secara statistika (tidak terlalu panjang dan tidak terlalu pendek), (5) ketersediaan informasi pada database di GenBank (Madigan *et al.*, 2012). Bakteri dapat dikatakan satu spesies apabila memiliki kemiripan sekuen gen 16S rRNA lebih dari 97% (Vandame *et al.*, 1996).



Gambar 2.10 Struktur 2D-3D dari gen 16S rRNA (Yang *et al.*, 2016).

BAB 3

METODA PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan selama bulan Juli – Desember 2017 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi jurusan Biologi ITS Surabaya, Laboratorium Karakterisasi Material jurusan Teknik Material dan Metalurgi ITS, Laboratorium Energi LPPM ITS, Laboratorium Uji Beton Program Profesional Teknik Sipil ITS, dan Laboratorium Biologi Molekuler RSKI Universitas Airlangga.

3.2. Metode yang Digunakan

3.2.1. Isolasi Bakteri Karbonatogenik

Sebanyak 1 gram sampel tanah dari bukit Jaddih Bangkalan, bukit kapur Suci Gresik, dan stalakmit muda goa Akbar Tuban dihalustal dengan beton dan pestle yang sudah disterilisasi. Sampel tanah dan stalakmit yang sudah halus kemudian dilarutkan dengan menggunakan 9 ml air fisiologis dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 20 menit. Sampel kemudian diencerkan bertingkat hingga konsentrasi 10^{-3} . Pada masing-masing konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} diambil sebanyak 100 μ l dan diinokulasikan dengan metode tebar pada permukaan medium CCP (*Calcium Carbonate Precipitation*) agar (Wei *et al.*, 2015). Sampel pada medium CCP agar kemudian diinkubasi di dalam inkubator dengan 37°C selama 1 minggu. Isolat bakteri karbonatogenik akan menunjukkan zona presipitasi CaCO_3 disekitar koloni setelah 1 minggu inkubasi. Isolat bakteri yang tumbuh dipurifikasi dengan menggunakan medium CCP agar baru hingga didapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal bakteri kemudian digunakan untuk proses karakterisasi secara fenotip. Karakter fenotip yang diamati adalah bentuk sel, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji katalase, uji oksidase, uji motilitas, uji kebutuhan oksigen. Uji konfirmasi kemampuan

menghasilkan urease dilakukan dengan menggunakan metode gores pada *Christensen-urea* agar (Hammad *et al.*, 2013). .

3.2.2. Karakterisasi Fenotip

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan pembuatan preparat ulas. Kemudian preparat ulas ditetesi dengan larutan kental violet sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir. *Gram Iodine Mordant* (Emerck) ditetaskan sebanyak 2-3 tetes diatas permukaan preparat kemudian didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan etil alkohol 95% setetes demi setetes hingga kristal violet tercuci dan dicuci dengan air mengalir. Preparat selanjutnya ditetesi dengan safranin selama 45 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

Pewarnaan endospora

Pewarnaan endospora dilakukan dengan pembuatan preparat ulas. Kemudian preparat ulas ditempatkan pada bak pewarnaan. Preparat ulas ditutup penuh dengan menggunakan kertas saring. Kemudian zat warna malakit hijau ditetaskan dengan pipet Pasteur ke permukaan kertas saring secara merata dan selanjutnya dipanaskan diatas nyala api bunsen selama 5 menit dan didinginkan. Setelah preparat dingin kemudian kertas saring dibuang dan preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya preparat diwarnai dengan safranin selama 1 menit dan dibilas dengan air mengalir dan dikering anginkan. Preparat ditutup dengan gelas penutup. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan ditetesi dengan minyak imersi kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

Uji motilitas

Uji motilitas dapat diperoleh dari uji produksi H_2S dan gas. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya sebaran pada daerah bekas inokulasi yang berarti bakteri melakukan aktivitas pergerakan (motil) (Harley dan Prescott, 2002).

Uji kebutuhan oksigen

Sebanyak 3 gram agar dan 29,5 gram medium *thioglycollate* (Oxoid, Inggris) dilarutkan ke dalam 1 liter akuades dan dipanaskan di atas pemanas sampai agar terlarut dan menjadi homogen. Kemudian medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 7 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit pada tekanan 1,5 atm. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, tabung reaksi yang berisi medium langsung dimasukkan ke dalam water bath yang suhunya diatur setinggi $50^{\circ}C$ untuk mencegah agar kembali memadat. Setelah suhu medium teradaptasi sekitar $50^{\circ}C$ yang ditandai dengan medium terasa hangat-hangat kuku, kemudian satu ose isolat bakteri berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam medium tersebut secara aseptis. Tabung reaksi kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex agar bakteri menyebar merata. Setelah masa inkubasi 48 jam pada suhu $37^{\circ}C$, diamati pola pertumbuhan isolat bakteri. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh di permukaan medium maka isolat tersebut merupakan bakteri aerob obligat. Apabila isolat tersebut tumbuh sepanjang kolom tabung reaksi, tetapi pertumbuhan terpekatnya pada permukaan agar, maka isolat tersebut adalah anaerob fakultatif. Apabila isolat bakteri tumbuh pada sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat tersebut adalah bakteri anaerob aerotoleran. Apabila isolat bakteri tumbuh hanya di bawah permukaan agar, tetapi tidak sepanjang kolom tabung reaksi maka isolat tersebut adalah bakteri mikroaerofilik. Sedangkan apabila isolat bakteri hanya tumbuh pada dasar tabung reaksi, maka isolat tersebut adalah anaerob obligat (Cappuccino dan Sherman, 2001; Harley dan Prescott, 2002).

Uji katalase

Sebanyak satu tetes H_2O_2 3% ditetaskan di atas kaca objek steril kemudian satu ose isolat bakteri diinokulasikan secara aseptis. Hasil positif ditandai dengan

timbulnya gas atau gelembung udara disekitar goresan bakteri tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

Uji okidase

Satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam dioleskan ke permukaan kertas oksidase (Oxoid, Inggris) secara aseptis. Hasil uji positif apabila setelah 5 detik terbentuk warna ungu pada kertas oksidase tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

Uji konfirmasi urease

Uji dilakukan dengan cara diambil satu ose isolat bakteri bermur 24 jam kemudian diinokulasikan dalam medium *Christensen-urea* agar (Hammes *et al.*, 2003) (Lampiran 2). Isolat kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2-5 hari. Jika terjadi perubahan warna medium dari warna kuning menjadi warna merah muda menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim urease yang mampu menghidrolisis urea dan menghasilkan amonium yang akan meningkatkan pH medium menjadi alkalin.

3.2.3. Produksi Kristal CaCO₃

Setelah proses purifikasi ulang tahap selanjutnya adalah produksi dan penghitungan jumlah CaCO₃ terpresipitasi pada medium cair NB-U/Ca (Lampiran 2). Uji dilakukan dengan cara menyiapkan inokulum bakteri dengan menginokulasikan satu ose isolat bakteri ke dalam medium NB pH 9 sebanyak 50 mL kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Bakteri yang tumbuh pada NB pH 9 tersebut selanjutnya diambil 6 ml inokulum bakteri (OD: 0.9 pada panjang gelombang 600 nm) dan dicampurkan ke dalam NB-U/Ca sebanyak 50 ml. Campuran inokulum bakteri dengan NB-U/Ca kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 hari dan diagitasi dengan *rotary shaker* pada kecepatan 130 rpm.

Kertas saring dipotong melingkar dengan diameter 5 cm dan ditimbang masing-masing beratnya (*W_f*). Berat CaCO₃ yang terbentuk dapat diketahui dengan cara melewati inokulum bakteri pada NB-U/Ca pada kertas saring sehingga kristal CaCO₃ yang terbentuk terpisah dari medium dan bakteri. Kertas saring dan kristal CaCO₃ kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 60°C selama 4 jam, kemudian

ditimbang berat CaCO_3 yang terpresipitasi. Perhitungan berat CaCO_3 yang terpresipitasi (W_c) ditentukan melalui rumus berikut:

$$W_c = W_{fc} - W_f$$

Dimana W_{fc} merupakan berat kertas saring dengan presipitan CaCO_3 , dan W_f merupakan berat kering kertas saring kosong (Hammad *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil uji berat CaCO_3 terpresipitasi pada medium cair bakteri yang mampu membentuk CaCO_3 digunakan untuk uji karakterisasi CaCO_3 , identifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA, identifikasi adanya gen ureC, dan aplikasi pada retakan beton.

3.2.4. Karakterisasi Kristal CaCO_3

Karakterisasi kristal CaCO_3 dilakukan menggunakan analisa XRD (*X-Ray Diffraction*) dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) dengan menggunakan kristal CaCO_3 yang berhasil dipresipitasi saat percobaan produksi dan perhitungan berat CaCO_3 .

3.2.4.1. X-Ray Diffraction (XRD)

Kristal CaCO_3 dari hasil penimbangan selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan beton dan pestle. Sampel kemudian dihomogenisasi dengan larutan etanol untuk dianalisa dengan menggunakan *X-Ray Diffraction* (XRD) di Laboratorium Karakterisasi Material, Jurusan Teknik Material dan Metalurgi, ITS. Parameter instrumen diatur pada tegangan 40-kV dengan arus 35-mA. Pemindaian dilakukan pada 20° sampai 60° 2θ dengan kecepatan $0.01^\circ/\text{s}$. Titik tpuncak pada d(112) digunakan untuk penentuan mineral kalsit (Wei *et al.*, 2015).

3.2.4.2. Scanning Electron Micoscopy (SEM)

Morfologi kristal CaCO_3 yang terpresipitasi diamati dengan menggunakan SEM (Carl-Zeiss®). Kristal kemudian direkatkan pada pin sampel SEM untuk dilapisi dengan campuran emas/palladium. Proses pemindaian dilakukan pada akselerasi voltase 25 kV dengan perbesaran 2500-7500 kali (Wei *et al.*, 2015).

3.2.5. Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri

3.2.5.1. Isolasi DNA genom bakteri

Proses isolasi DNA genom bakteri dilakukan menurut protokol kit QiAMP DNA Mini Kit (Qiagen®, Germany) dengan penambahan modifikasi minor. Sebanyak 2-3 koloni bakteri yang telah murni diinokulasikan ke dalam mikrotube 1,5 ml steril yang mengandung larutan lisis sel yang terdiri dari buffer ATL 180 µl, proteinase-K 20 µl, dan lisozim 5 µl. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Etanol absolut sebanyak 200 µl ditambahkan ke dalam mikrotube dan dihomogenkan dengan vortex selama 15 detik. Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *SpinColumn* 2 ml secara hati-hati kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. *SpinColumn* tersebut dipindah ke mikrotube yang baru. Larutan buffer AW1 sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam *SpinColumn* secara hati-hati, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. *SpinColumn* tersebut dipindahkan ke dalam mikrotube yang baru. Larutan buffer AW2 sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam *SpinColumn* secara hati-hati, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. *SpinColumn* tersebut dipindahkan ke mikrotube 1,5 baru. Larutan buffer AE sebanyak 200 µl ditambahkan pada *SpinColumn* dan diinkubasi selama 1 menit. *SpinColumn* kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit. *SpinColumn* dibuang dan filtrat yang mengandung DNA didalam mikrotube disimpan dalam suhu -20°C hingga akan digunakan. DNA genom bakteri yang didapatkan kemudian diukur kemurniannya dengan nanodrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.2.5.2. Polymerase Chain Reaction Gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menyiapkan 50 µl campuran reaksi PCR yang terdiri dari 25 µl OneTaq® Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer (New England BioLabs, U.S., komposisi MasterMix terdapat dalam Lampiran 2), 1 µl forward primer 27F, 1 µl reverse primer 1492R (Sekuen primer terdapat dalam Tabel 3.1), 2 µl DNA cetakan hasil dari ekstraksi DNA genomik

bakteri, dan *nuclease free water* hingga volume reaksi total menjadi 50 µl. Program PCR pada *thermocycler* terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 30 detik. Proses dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, dilanjutkan dengan *annealing* pada suhu 50°C selama 50 detik, kemudian ekstensi pada suhu 68°C selama 1.5 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 68°C selama 10 menit. Hasil proses PCR kemudian divisualisasikan pada gel agarosa (Wei *et al.*, 2015).

Tabel 3.1 Sekuen primer untuk amplifikasi gen 16S rRNA.

Nama	Sekuen	Panjang	Referensi
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	17 bp	Barker <i>et al.</i> , (2003)
1492R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'	16 bp	

3.2.5.3. Polymerase Chain Reaction Gen *ureC*

Gen pengkode enzim urease bakteri (*ureC*) diamplifikasi dengan menyiapkan 50 µl campuran reaksi PCR yang terdiri dari 25 µl OneTaq® Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer (New England BioLabs, U.S., komposisi MasterMix terdapat dalam Lampiran 2), 1 µl forward primer ureC-F, 1 µl reverse primer ureC-R (Sekuen primer terdapat dalam Tabel 3.2), 2 µl DNA cetakan hasil dari ekstraksi DNA genomik bakteri, dan *nuclease free water* hingga volume reaksi total menjadi 50 µl. Program PCR pada *thermocycler* terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 30 detik, selanjutnya dilanjutkan pada 35 siklus pada 94°C selama 30 detik, 50°C selama 50 detik, 68°C selama 30 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 68°C selama 10 menit (Reeds, 2001).

Tabel 3.2 Sekuen primer untuk amplifikasi gen *ureC*

Nama	Sekuen	Referensi
ureC-F	5'-TGGGCCTTAAAATHCAYGARGAYTGGG-3'	Reeds, 2001.
ureC-R	5'-GGTGGTGGCACACCATNANCATRTC-3'	

3.2.5.4. Agarose Gel Electrophoresis

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan cara melarutkan 1,5 gram bubuk agarosa dalam 100 ml 1x buffer Tris-Borate-EDTA (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA). Penambahan buffer diupayakan supaya tidak melebihi 1/3 kapasitas dari wadah. Larutan kemudian dipanaskan dengan menggunakan *microwave* hingga bubuk agarosa terlarut sempurna. *Loading dye* ditambahkan pada gel agarose yang masih cair. *Loading dye* yang paling aman digunakan adalah GelRed/GelGreen (BioTium®). GelRed/GelGreen merupakan pewarna DNA yang sangat sensitif, stabil dan aman untuk lingkungan yang dibuat untuk mengganti penggunaan EtBr untuk mewarnai dsDNA, ssDNA, atau RNA di dalam gel agarose (Crisafuli *et al.*, 2015). Penambahan *loading dye* bertujuan untuk mengetahui perpindahan pita DNA selama elektroforesis berlangsung. Larutan agarosa kemudian dituang pada *tray* yang telah dipasang *comb*. Gel agarosa dibiarkan membeku pada suhu ruang (Lee *et al.*, 2007).

Gel agarosa kemudian digenangi dengan buffer TBE 1X hingga tergenang sempurna. DNA dari masing-masing sampel diambil 5 µl untuk diload pada gel agarose. Power supply dinyalakan pada tegangan 100V/cm selama 30 menit (Caccamo *et al.*, 2001). Hasil gel elektroforesis kemudian dicitrakan dengan GelDoc menggunakan sinar UV. Ukuran gen 16S rRNA adalah sekitar 1350-1500 bp (Srinivasan *et al.*, 2015) dan ukuran gen *ureC* adalah 340 bp (Reeds, 2001).

3.2.5.5. Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan sesuai protokol AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Seoul, Korea Selatan). Pertama-tama ditambahkan buffer PB sebanyak 225 µl ke dalam 45 µl produk PCR. Campuran buffer PB dan produk PCR kemudian dipindahkan ke *BindingColumn* yang diletakkan di atas tabung koleksi 2 ml. Campuran kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000 x g selama 60 detik. Cairan yang terdapat dalam tabung koleksi dibuang. Buffer WB sebanyak 500 µl ditambahkan pada *BindingColumn* kemudian disentrifuge pada kecepatan 10.000 x g. Cairan yang terdapat dalam tabung koleksi dibuang. Proses pencucian dengan buffer WB diulang sebanyak 1 kali. Sampel DNA pada *BindingColumn*

dikering anginkan selama 2 menit. *Binding Coloumn* yang telah kering ditempatkan pada tabung koleksi yang baru, kemudian ditambahkan dengan 30 μ l buffer EL dan dibiarkan selama 1 menit. Sampel DNA hasil PCR pada tabung koleksi disentrifuge pada kecepatan 10.000 \times g selama 60 detik. Sampel DNA hasil PCR disimpan pada suhu -20°C untuk persiapan proses sekuensing.

3.2.5.6. Sekuensing Gen 16S rRNA dan *ureC*

Produk PCR yang telah dimurnikan kemudian dikirim ke Bioneer Corp. (South Korea) untuk *sequencing* metode Sanger. Setelah sekuen nukleotida berupa elektroforegram diterima, kemudian sekuen digabungkan antara primer *forward* dan *reversenya* dengan menggunakan FinchTv dan BioEdit. Sekuen gabungan kemudian ditentukan nilai similaritas antara sekuen nukleotida sampel dengan sekuen yang telah terdaftar di database GenBank (Nonthapa dan Chanchao, 2015).

3.2.5.7. Konstruksi Pohon Filogenetik Gen 16S rRNA

Sekuen nukleotida hasil sequencing dari BIONEER, South Korea dibandingkan dengan sekuen yang telah terdaftar di GenBank melalui BLAST-N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk proses identifikasi. Pada proses BLAST-N dipilih 20 related sampel dan outgroup untuk proses konstruksi pohon filogenetik (Yoshiyama dan Kimura, 2009). Sekuen nukleotida sampel dan related sampel kemudian disetarakan dengan program Clustal W yang terdapat pada software MEGA 7. Jarak hubungan antar sekuen nukleotida bakteri diketahui dengan algoritma *Neighbor Joining* (NJ) dan model kalkulasi dua parameter Kimura. Data dukungan statistik didapatkan dengan bootstrap 1000 kali pengulangan (Fenselstein, 1985).

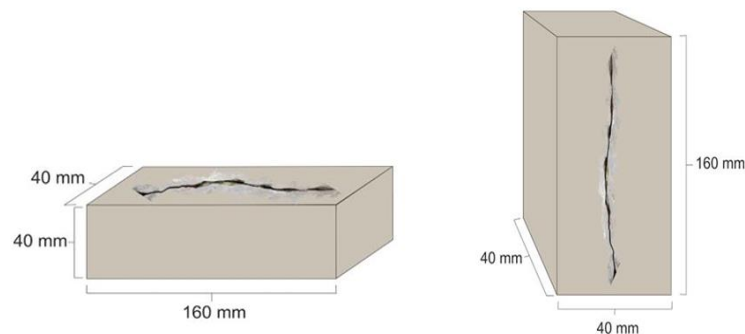
3.2.5.8. Penentuan Sekuen Asam Amino Gen *ureC*

Sekuen hasil sekuensing dari Bioneer® kemudian diterjemahkan menjadi sekuen asam amino menggunakan BLASTX. Sekuen *deduced amino acid* kemudian diketahui nama dan fungsi protein yang dibentuk dengan mensejajarkannya pada CCD (*Conserved Domain Database*). Protein yang didapatkan kemudian dideskripsikan fungsi dan karakternya.

3.2.6. Aplikasi Bakteri Sebagai Biofiller

3.2.6.1. Produksi Beton

Produksi beton dilakukan dengan cara mencampurkan semua komposisi pembuatan beton dengan perbandingan faktor air semen (FAS) 0,6 (Mulyono, 2004). Komposisi bahan untuk membuat satu spesimen beton adalah sebagai berikut, semen sebanyak 0,051563 kg, air sebanyak 0,025308 kg, dan material pengisi serat 0,253688 kg. Setelah dicampurkan adonan beton tersebut dicetak dengan cetakan berukuran 50 x 50 x 50 mm dan diberi plastik mika yang panjangnya 40 mm dengan ketebalan 0,20 mm pada bagian tengahnya. Beton kemudian dikeringkan selama dua hari dan direndam dalam air selama 28 hari untuk proses *curing*.



Gambar 3.1 Ilustrasi dimensi beton dan retakannya untuk aplikasi biosemen.

3.2.6.2. Aplikasi Biosemen Pada Beton

Aplikasi isolat bakteri sebagai agen biosemen dilakukan menurut Sharma *et al.* (2017). Pertama-tama isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NB pada suhu 30°C dan diagitasi dengan 150 putaran per menit. Isolat kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kultur bakteri kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4.000g pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pelet sel bakteri dicuci sebanyak tiga kali

dengan menggunakan buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Supernatan hasil pencucian dibuang dan pelet sel bakteri dilarutkan dalam 4 ml (Lampiran 2). Suspensi sel bakteri sebanyak 500 μ l, kemudian diaplikasikan setiap hari pada *microcrack* beton selama 8 hari berturut-turut dan diinkubasi dalam *humid chamber* (100% RH) pada suhu 30°C. Retakan mikro pada spesimen beton kemudian diamati secara makroskopis dan mikroskopis dengan menggunakan mikroskop stereo. Pengamatan retakan mikro dilakukan setiap dua hari sekali terhadap 3 titik pengamatan yang masing-masing berjarak 1 cm.

3.3 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan 2 metode analisa deskriptif yaitu analisa deskriptif kuantitatif dan analisa deskriptif kualitatif. Analisa deskripsi kuantitatif digunakan pada uji berat kristal CaCO_3 . Sedangkan analisa deskriptif kualitatif digunakan untuk hasil karakterisasi kristal CaCO_3 menggunakan XRD dan SEM, hasil BLAST pada NCBI, konstruksi pohon filogenetik spesies menggunakan MEGA 7, deteksi gen *ureC*, dan kemampuan bakteri sebagai biofiller ketika diaplikasikan pada retakan beton.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi dan Karakterisasi Fenotip Isolat

Isolasi digunakan untuk memisahkan isolat bakteri karbonatogenik dari bakteri lainnya yang berasal dari sampel tanah. Medium selektif yang digunakan adalah CCP (*Calcium Carbonate Precipitation*) agar. Medium CCP merupakan medium yang digunakan untuk mendeteksi presipitasi CaCO_3 . Medium CCP mengandung urea sebagai prekursor untuk pembentukan ion karbonat dan CaCl_2 berfungsi sebagai sumber ion kalsium (Ca^{2+}). Setelah inkubasi satu minggu didapatkan 6 isolat bakteri yang mampu menghasilkan zona presipitasi di sekitar koloni. Zona presipitasi terbentuk karena koloni yang tumbuh diduga menghasilkan enzim urease sehingga mampu mempresipitasi CaCO_3 . Keenam isolat bakteri tersebut diberi kode JA1, JB2, JB3, dan JA4 untuk isolat yang berasal dari sampel tanah kapur bukit Jaddih Bangkalan, AK4 untuk isolat yang berasal dari sampel stalaktit muda goa Akbar, dan SU1 untuk isolat yang berasal dari bukit kapur Suci Gresik.

4.2. Pertumbuhan dan Produksi CaCO_3

4.2.1. Kurva Pertumbuhan Isolat

Pola pertumbuhan dari hasil inkubasi selama 168 jam menghasilkan pola pertumbuhan yang berbeda (Gambar 4.2). Pola pertumbuhan yang berbeda pada bakteri diasumsikan menunjukkan spesies yang berbeda pula. Pada pola pertumbuhan isolat bakteri JB3, JA4, dan SU1 tidak dijumpai adanya fase adaptasi, sedangkan isolat JB2, JA1, dan AK4 menunjukkan fase adaptasi pada jam ke-24 setelah inkubasi. Fase eksponensial pada isolat JB3, JA4, dan SU1 terjadi pada 24 jam setelah inkubasi. Hal tersebut berbeda dengan isolat JB2, JA1, dan AK4 yang menunjukkan fase eksponensial pada jam ke 48. Fase stasioner pada isolat JB3, JA4, dan SU1 dimulai pada jam ke-48 hingga jam-168. Sedangkan fase stasioner isolat

JB2, JA1, dan AK4 berlangsung pada jam ke-72 hingga jam-168. Pada penelitian ini semua isolat uji belum menunjukkan fase kematian karena dilakukan pemanenan kristal pada jam ke-168. Pada penelitian ini belum dijumpai fase kematian karena pada jam ke-168 dilakukan pemanenan kristal CaCO_3 .

4.2.2. Produksi Kristal CaCO_3

Skrining Kualitatif

Produksi kristal CaCO_3 secara kualitatif menggunakan media selektif CCP agar. Produksi kristal CaCO_3 mulai tampak setelah 24 jam inkubasi. Kristal CaCO_3 yang terbentuk terlihat pada sekitar koloni bakteri. Proses pembentukan kristal CaCO_3 pada medium CCP agar lebih cepat dibandingkan dengan CCP cair. Hal ini dikarenakan kondisi inkubasi isolat pada medium CCP padat dilakukan pada inkubator suhu 37°C . Sedangkan, pada medium CCP cair diinkubasi pada suhu ruang 30°C . Pada suhu 37°C sel bakteri tumbuh lebih cepat dibandingkan pada suhu ruang 30°C .

Skrining Kuantitatif

Endapan serbuk berwarna putih kekuningan didasar medium terbentuk pada jam ke-48 setelah inkubasi. Jumlah endapan pada dasar medium semakin hari semakin bertambah sampai dengan hari ke tujuh. Semua isolat bakteri mampu memproduksi CaCO_3 250 mg/50 ml. Isolat yang mampu menghasilkan CaCO_3 paling banyak adalah isolat bakteri AK4 dengan berat 376,25 mg/50 ml, sedangkan isolat bakteri dengan berat CaCO_3 paling sedikit adalah 277,9 mg/50 ml. Nilai OD starter tidak berkorelasi langsung dengan berat produk CaCO_3 yang dihasilkan.

4.3. Karakterisasi Kristal CaCO_3

Karakterisasi kristal CaCO_3 dilakukan untuk menentukan fase kristal yang terbentuk. Tiga fase kristal CaCO_3 anhidrat yang paling banyak diketahui adalah vaterit, aragonit, dan kalsit. Karakterisasi kristal CaCO_3 dilakukan melalui dua pendekatan yaitu difraksi sinar-X (XRD) dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

4.3.1. Analisa XRD

Dalam penelitian ini keberadaan dan karakterisasi struktur CaCO_3 hasil MICP dapat dibuktikan dengan XRD. XRD digunakan untuk menyediakan informasi struktur, fase, orientasi kristal (tekstur), dan parameter struktural lainnya seperti ukuran serbuk, kristalinitas, ketegangan, dan kerusakan kristal (Bonaciu *et al.*, 2015). Data yang didapatkan kemudian dianalisa dengan database JCPDS (*Joint Committee for Powder Diffraction Standards*) yang terdapat pada aplikasi Match!3. Berdasarkan analisa menggunakan database JCPDS terdapat tiga jenis morfologi kristal CaCO_3 yang mampu dibentuk oleh isolat bakteri yaitu kalsit, vaterit, dan kristal lain yang belum dapat ditentukan fasenya dengan rumus kimia CaCO_3 .

4.3.2. Analisa SEM

Analisa SEM (*Scanning Electron Microscopy*) digunakan untuk mengetahui morfologi fase kristal CaCO_3 yang dibentuk oleh isolat bakteri karbonatogenik. Fase bentuk CaCO_3 diketahui dengan analisa morfologi dan topologi permukaan kristal. Hasil analisa SEM menunjukkan bahwa isolat JA1, JB2, JA4, dan SU1 menghasilkan fase kristal paling dominan yaitu kalsit. Pada isolat JB3 dan AK4 menunjuk jenis kristal paling dominan adalah vaterit.

4.4. Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri

4.4.1. Ekstraksi DNA Genom

Proses ekstraksi DNA bertujuan untuk mendapatkan DNA genom bakteri yang digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses PCR. Pengukuran hasil konsentrasi dan kemurnian DNA genom dihitung dengan menggunakan NanoDrop Spectrophotometer ND-1000. Hasil spektrofotometri dengan menggunakan nanodrop menunjukkan konsentrasi DNA yang didapatkan berkisar 7,04 - 43,69 ng/ μL . Kemurnian DNA berdasarkan pengukuran absorbansi 260/280 nm pada isolat JA1, JB2, JB3, JA4, dan AK4 berkisar antara 1,80-1,91 yang menunjukkan kemurnian yang tinggi. Sedangkan, nilai rasio 260/280 nm pada isolat SU1 adalah 2.05 yang menunjukkan kemurnian yang kurang baik.

4.4.2. PCR Gen 16S rRNA

Pada penelitian ini amplifikasi gen 16S rRNA bertujuan untuk memperbanyak fragmen gen 16S rRNA yang urutan nukleotidanya dapat digunakan untuk proses identifikasi isolat bakteri secara molekuler. Gen 16S rRNA digunakan sebagai marka gen karena pada gen tersebut terdapat dua daerah yang sangat lestari yang baik digunakan untuk merancang primer serta terdapat pula daerah yang urutan nukleotidanya sangat bervariasi, sehingga banyak digunakan untuk identifikasi bakteri (Tringe dan Hugenholtz, 2008). Hasil elektroforesis produk PCR menghasilkan semua isolat menunjukkan pita berukuran 1400 bp.

4.4.3. Analisa BLAST Pada GeneBank

Sekuen 16S rRNA yang sudah digabung dari hasil amplifikasi primer 27F dan 1492R diuji dengan BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Test*) pada database sekuen 16S rRNA bakteri dan archea di GeneBank NCBI untuk mencari *related sequence* terdekat dan menentukan tingkat similaritasnya (Altschul *et al.*, 1997; Madden, 2013). Berdasarkan hasil BLAST sekuen nukleotida 16S rRNA dari bakteri uji menunjukkan nilai kesamaan diatas 97% dengan sekuen nukleotida referensi yang terdapat di GeneBank.

4.4.4. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Spesies

Pohon filogenetik direkonstruksi dengan menggunakan metode *Neighbor Joining*. Jumlah perbedaan nukleotida dapat diketahui melalui proses *alignment* dengan ClustalW. Tujuan *alignment* adalah untuk membandingkan satu atau lebih sekuen nukleotida dan mendapatkan dasar untuk kalkulasi keanekaragaman sekuen untuk menduga hubungan evolusioner diantara taksa. Pada penelitian ini didapatkan genus *Bacillus*, *Lysinibacillus*, dan *Sporosarcina* yang didukung oleh hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ketiga genus tersebut merupakan bakteri yang mampu menghidrolisis urea dan mengendapkan CaCO_3 yang diisolasi dari daerah kapur.

4.5. Gen *ureC* dan Keanekaragamannya

4.5.1. Deteksi gen *ureC* dengan PCR

Pada penelitian ini PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gen *ureC* digunakan untuk mendeteksi adanya gen *ureC* pada genom bakteri isolat uji. Hasil elektroforesis produk PCR *ureC* menunjukkan semua isolat bakteri terdapat gen *ureC* pada DNA genomnya. Berat molekul gen *ureC* yang didapatkan adalah 340 kb.

4.5.2. Analisa BLASTX di ProteinBank

Sekuen gabungan *ureC-F* dan *ureC-R*, dianalisa dengan menggunakan BLASTX. BLASTX merupakan *Basic Linkage Alignment Sequence Test* pada database protein dengan data input berupa sekuen nukleotida. Pada program tersebut didapatkan kemungkinan asam amino yang terbentuk dari sekuen uji, menentukan nama protein yang terbentuk dari sekuen asam amino uji pada *Conserve Domain Database*, dan menentukan similaritas sekuen asam amino uji dengan asam amino yang ada pada protein database (NCBI). Analisa gen *ureC* dilakukan dengan menerjemahkannya terlebih dahulu ke sekuen asam amino karena similaritas *ureC* pada tingkat nukleotida lebih rendah dibandingkan pada tingkat protein karena degenerasi pada kode genetik (Reeds, 2001).

4.6. Aplikasi Biofiller pada Retakan Beton

Uji dilakukan dengan menginokulasikan kultur sel bakteri pada medium CCP, aplikasi dilakukan selama 10 hari berturut-turut pada spesimen beton dengan retakan mikro buatan ($\leq 0,25$ mm). Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa kemampuan bakteri untuk menutup retakan beton berbeda-beda. Isolat bakteri uji umumnya diperkirakan mulai tumbuh pada hari ke 4 setelah perlakuan. Hal ini dicirikan dengan adanya endapan berwarna kuning pada retakan beton. Pada pengamatan hari ke-6 hingga hari ke-10 nampak bahwa endapan kuning tersebut semakin hari semakin menebal terutama pada isolat JA1, JB2, JA4, AK4, dan SU1.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Hasil isolasi mendapatkan enam isolat bakteri kabanatogenik yaitu JA1, JB2, JB3, JA4, AK4, dan SU1 yang mampu menghasilkan endapan CaCO_3 dengan jumlah lebih dari 275 mg/ 50 ml CCP.
2. Berdasarkan analisa XRD dan SEM bentuk dominan kristal CaCO_3 dari isolat JA1, JB2, JA4, dan SU1 adalah kalsit, sedangkan bentuk dominan kristal CaCO_3 dari isolat JB3 dan AK4 adalah vaterit.
3. Identifikasi molekuler dengan marka gen 16S rRNA dan polifasik menunjukkan isolat JA1 teridentifikasi sebagai *B. huizhouensis*, isolat JB2 teridentifikasi sebagai *L. boronitolerans*, isolat JB3 teridentifikasi sebagai *B. galactosidilyticus*, isolat JA4 teridentifikasi sebagai *Sporosarcina* spp., isolat AK4 teridentifikasi sebagai *B. niacini*, dan isolat SU1 teridentifikasi sebagai *B. lentus*.
4. Isolat JA1, JB2, JA4, AK4, dan SU1 diketahui mampu menutup retakan pada beton, sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen biosemen retakan beton.

5.2 Saran

Untuk memaksimalkan kemampuan bakteri ketika diaplikasikan sebagai agen biosemen perlu dilakukan aklimatisasi dan seleksi bakteri manakah yang mampu bertahan pada pH lebih dari 11. Selain itu proses enkapsulasi bakteri ke dalam suatu matriks dapat meningkatkan viabilitas sel bakteri ketika diaplikasikan sebagai agen biosemen dalam beton. Isolat yang unggul sebagai agen biosemen dan metode aplikasi yang tepat diharapkan menjadi solusi untuk mengatasi persoalan kekuatan dan keawetan material konstruksi beton di Indonesia.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

DAFTAR PUSTAKA

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., and Reddy, M.S. (2009), "Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 36, hal. 433-438.
- Achal, V., Mukherjee, A., and Reddy, M.S. (2010), "Biocalcification by *Sporosarcina pasteurii* using Corn steep liquor as nutrient source", *Industrial Biotechnology*, Vol. 6, hal. 170-174.
- Achal, V., Mukherjee, A., and Reddy, M.S. (2011), "Microbial concrete- a way to enhance the durability of building structure", *J. Mater. Civ. Eng.*, Vol. 23, hal. 730-734.
- Achal, V., Mukherjee, A., Goyal, S., and Reddy, M.S. (2012), "Corrosion prevention of reinforced concrete with microbial calcite precipitation", *ACI Mater. J.*, Vol. 109, hal. 157-164.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., and Fujiwara, T. (2007), "Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 57, hal. 1117-1125.
- Ahmed, I., Sin Y., Paek, J., Ehsan, M., Hayat, R., Iqbal, M., and Chang, Y.H. (2014), "Description of *Lysinibacillus pakistanensis* sp. nov.", *International Journal of Agriculture and Biology*, Vol. 16, hal. 447-450.
- Al-Thawadi, S.M. (2011), "Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanisms of Strength Enhancement of Sand", *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, Vol. 1, hal. 98-114.
- Altschul, S.F., Thomas, L.M., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25, hal. 3389-3402.
- Anbu, P., Kang, C.H., Shin, Y.J., and So, J.S. (2016), "Formation of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications", *SpringerPlus*, Vol. 5, no. 250, hal. 1-26.
- Andrews, R.K., Brakeley, R. L., and Zenner, B. (1984), *Urea and Urease. Advance in inorganic biochemistry*, Elsevier Science, New York.
- Arnold, T.E., Meyering, M.T., Chesterson, R.S. (2005), "Nucleic acid binding matrix", *United States patent US 6869532 B2*, CUNO Incorporated.

- Baker, G., Smith, J., and Cowan, D.A. (2003), "Review and re-analysis of domain specific 16S primer", *J. Microbiol. Methods.*, Vol 55, hal. 541-555.
- Bang, S.S., Lippert, J.J., Yerra, U., Muukutla, S., and Ramakrishnan, V. (2010), "Microbial calcite, a bio-based smart nanomaterial in concrete remediation". *Int. J. Smart. Nano. Mater.*, Vol. 1, hal. 28-39.
- Banks, E.D., Taylor, N. M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T. M., Barton, H. A. (2010), "Bacterial Calcium Carbonate Precipitation in Cave Environments: A Function of Calcium Homeostasis", *Geomicrobiology Journal*, Vol. 27, hal. 444-454.
- Barabesi, C., Galizzi, A., Mastromei, G., Rossi, M., Tamburini, E., and Perito, B. (2007), "*Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization", *J. Bacteriol.* Vol. 189, hal. 228-235.
- Bazylinski, D.A., and Frankel, R.B. (2003), "Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes", *Rev. Mineral Geochem.*, Vol. 54, hal. 95-114.
- Benini, S., Gessa, C., and Ciurli, S. (1996), "*Bacillus pasteurii* urease: A heteropolymeric enzyme with a binuclear nickel active site", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 28, no. 6, hal. 819-821.
- Benini, S., Repniewski, W.R., Wilson, K.S., Meletti, S., Ciurli, S., and Mangani, S. (1999), "A new proposal of urease mechanism based on the crystal structure of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickel", *Structure*, Vol. 7, hal. 205-216.
- Black, J.G and Black, L.J. (2012), *Microbiology Principles and Exploration*, 8th Edition, John Wiley and Sons Inc., USA.
- Bonaciu, A.A., Udristioiu, E.G., and Aboul-Enein, H.Y. (2015), "X-Ray Diffraction: Instrumentation and Application", *Critical Review in Analytical Chemistry*, Vol. 45, no. 4, hal. 289-299.
- Burbank, M.B., Weaver, T.J., Williams, B.C., and Crawford, R.L. (2012), "Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria", *Geomicrobiology Journal*, Vol. 29, no. 4, hal. 389-395.
- Braissant, O., Verrecchia, E.P., Aragno, M. (2002), "Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?", *Naturwissenschaften*, Vol. 89, hal. 366-370.
- Brown, T.A. (2010), *GENE CLONING & DNA ANALYSIS, An Introduction* 6th Edition, Wiley-Blackwell, UK, hal. 13.
- Castanier, S., Le Metayer-Level, G., and Perthuisot, J.P. (1999), "Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view", *Sediment. Geol.* Vol. 126, hal. 9-23.

- Caccamo, D., Maugeri, T.L., and Gugliandolo, C. (2001), "Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 50, hal. 2009-2012.
- Chahal, N., Rajor, A., and Siddique, R. (2011), "Calcium carbonates precipitation by different bacterial strains", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10, no. 42, hal. 8359-8372.
- Chang, R., Kim, S., Lee, S., Choi, S., Kim, M., and Park, Y. (2017), "Calcium Carbonate Precipitation for CO₂ Storage and Utilization: A Review of the Carbonate Crystallization and Polymorphisms", *Frontiers in Energy Research*, Vol. 5, no. 17, hal. 1-12.
- Chen, J., and Xiang, L. (2009), "Controllable synthesis of calcium carbonate polymorphs at different temperatures", *Powder Technology*, Vol. 189, hal. 64-69.
- Chu, J., Stabnikov, V., and Ivanov, V. (2012), "Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil", *Geomicrobiol. J.*, Vol. 4, hal. 1-6.
- Conlan, S., Kong, H.H., and Segre, J.A. (2012), "Species -level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project", *PloS One*, Vol 7, hal. 1-12.
- Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Heyrman, J., Schumann, P., Landshoot, A.V., Logan, N.A., and de Vos, P. (2012), "*Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 62, hal. 1121-1127.
- Crisafuli, F.A., Ramos, F.B., and Rocha, M.S. (2015), "Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain", *Eur. Biophys. J.* Vol. 44., no. 1-2, hal. 1-7.
- Dancourt, M., Bollet, C., Carliz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., and Raoult, D. (2000), "16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates", *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 38, hal. 3623-3630.
- De Belie, N., and Wang, J. (2015). "Bacteria-based repair and self-healing of concrete", *Journal of Sustainable Cement-Based Material*, Vol. 5, hal. 35-56.
- De Chouden-Sanchez, V., and Gonzalez, L.A. (2009), "Calcite and aragonite precipitation under controlled instantaneous supersaturation: elucidating the role of CaCO₃ saturation state and Mg/Ca ratio on calcium carbonate polymorphisms", *J. Sediment Res*, Vol. 79, hal. 363-376.

- De Jong, J.T., Fritzges, M.B., and Nusslein, K. (2006), "Microbial induced cementation to control sand response to undrained shear", *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, Vol. 132, hal. 1381-1392.
- De Jong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., and Nelson, D.C. (2010), "Bio-mediated soil improvement", *Ecol. Eng.*, Vol. 136, hal. 197-210.
- De Leeuw, N.H., and Parker, S.C. (1998), "Surface Structure and Morphology of Calcium Carbonate Polymorphs calcite, Aragonite, and Vaterite: An Atomistik Approach", *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 102, no. 16, hal. 2914-2922.
- De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., and Verstraete, W. (2008), "Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete", *Construction and Building Materials*, Vol. 22, hal. 875-885.
- De Muynck, W., De Belie, N., and Verstraete, W. (2010), "Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review", *Ecological Engineering*, Vol. 36, no. 2, hal. 118-136.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., dan Whitman, W.B. (2009), *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition, Volume Three: The Firmicutes*, William and Wilkins, USA.
- De Yoreo, J.J., and Vekilov, P.G. (2003), "Principles of Crystal Nucleation and Growth", *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 54, no. 1, hal. 57-93.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., and Mukherjee. A. (2013), "Biomineralization of calcium carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 23, no. 5, hal. 707-714.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., and Mukherjee, A. (2014), "Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 172, hal. 2552-2561.
- Dhami, N.K., Alsubhi, W.R., Watkin, E., and Mukherjee, A. (2017), "Bacterial Community Dynamics and Biocement Formation during Stimulation and Augmentation: Implications for Soil Consolidation", *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8, hal. 1-17.
- Ehrlich, H.L. (1998), "Geomicrobiology: its significance for geology", *Earth-Science Reviews*, Vol. 45, no. 1, hal. 45-60.
- Errington, J. (2003), "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*", *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 1, hal. 117-126.

- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996), "Control of aragonite polymorphisms by mollusk shell macromolecules", *Science*, Vol. 271, hal. 67-69.
- Farugia, M.A., Macomber, L., and Hausinger, R.P. (2013), "Biosynthesis of the urease Metallocenter", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288, no. 19, hal. 13176-13185.
- Felsenstein, J. (1985), "Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap", *Evolution*, Vol. 39, hal. 783-791.
- Fettweis, J.M., Serrano, M.G., Sheth, N.U., Mayer, C.M., Glascock, A.L. (2012), "Species-level Classification of the Vaginal Microbiome", *BMC Genomics*, Vol. 13, no. 8, hal. 1-9.
- Fisher, S.H. (1999), "Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: viva la difference", *Molecular Microbiology*, Vol. 32, no. 2, hal. 223-232.
- Fredriksson, N.J., Hermansson, M., and Willen, B.M. (2013), "The Choice of Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant", *Plos ONE*, Vol. 8, no. 10, hal. 1-20.
- Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B.D., and Pal, S. (2005), "Use of microorganisms to improve the strength of cement mortar", *Cem. Concr. Res.*, Vol 35, hal. 1980-1983.
- Glazunova, O.O., Raoult, D., and Roux, V. (2009), "Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL*, and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*", *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 59, hal. 2317-2322.
- Gresham, T.L.T., Sheridan, P.P., Watwood, M.E., Fujita, Y., and Colwell, S.F. (2007), "Design and Validation of ureC-based Primers for Groundwater Detection of Urea-Hydrolyzing Bacteria", *Geomicrobiology Journal*, Vol. 24, hal. 353-364.
- Hammad, I.A., Talkhan, F.N., and Zoheir, A.E. (2013), "Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMBB 8841", *Journal of Applied Sciences Research*, Vol. 9, no. 3, hal. 1525-1533.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., and Siciliano, S.D. (2003), "Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 69, no. 8, hal. 4901-4909.
- Hausinger, R.P. (2004), "Metabolic Versatility of Prokaryotes for Urea Decomposition", *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, hal. 2520-2522.
- Heck, R.M., Farrauto, R.J., and Gulati, S.T. (2016), *Catalytic Air Pollution Control: Commercial Technology*, 3rd Edition, Wiley Publishing, US.

- Hedges, S.B. (1992), “The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetics studies”, *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 9, no. 2, hal. 366-369.
- Innis, M.A. Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (1990), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego.
- Ivanov, V., Chu, J., and Stabnikov, V. (2015), “Basics of Construction Microbial Biotechnology”, in *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*, Torgal, F.P., Labrincha, J.A., Diamanti, M.V., Yu, C.P., and Lee, H.K., Springer International Publishing, Switzerland, hal. 21-39.
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Pinar-Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M., and Gonzalez-Munoz, M.T. (2008), “Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone”, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, Vol. 62, no. 4, hal. 352–363.
- Joners, B.D., and Mobley, H.L. (1989), “*Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease”, *J. Bacteriol.*, Vol. 171, no. 12, hal. 6414-6422.
- Jonkers, H.M. (2007), “Self healing concrete: a biological approach”, in *Self Healing Materials: An alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science*, van der Zwaag S., Springer, Netherlands, hal. 195-204.
- Jonkers, H.M., and Schlangen, E. (2008), “Development of a bacteria-based self healing concrete”, dalam *Tailor Made Concrete Structures*, eds. Walraven and Stoelhorst, Taylor and Francis Group, London, hal. 425-430.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., and Schlangen, E. (2010), “Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete”, *Ecol. Engineer.*, Vol. 36, hal. 230–235.
- Kang, C.H., Choi, J.H., Noh, J., Kwak, D.Y., Han, S.H., So, J.S. (2014), “Microbially Induced Calcite Precipitation-based Sequestration of Strontium by *Sporosarcina pasteurii* WJ-2”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 174, hal. 2482-2491.
- Karplus, P.A., and Pearson, M.A. (1997), “70 Years of Crystalline Urease: What have We Learned?”, *Acc. Chem. Res.*, Vol. 30, no. 8, hal. 330-337.
- Kawaguchi, T., and Decho, A.W. (1999), “Confocal imaging in situ natural microbial communities and their extracellular polymeric secretion (EPS) using nanoplast resin”, *Biotechniques*, Vol. 27, no. 6, hal. 1246-1251.

- Kim, H.J., Eom, H.J., Park, C., Jung, J., Shin, B., Kim, W., Chung, N., Choi, I.G., and Park W. (2016), "Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* Strains Isolated from Concrete and Analysis of the Bacterial Community of Concrete", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 26, no. 3, hal. 540-548.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Matthias, H., and Glockner, F.O. (2012), "Evaluation of general 16S riosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity study", *Nucleic Acids Research*, Vol. 41, no. 1, hal.2-11.
- Kolter, R., Siegele, D.A., and Tormo, A. (1993), "The Stationary Phase of The Bacterial Life Cycle", *Annu. Rev. Microbiol.*, Vol. 47, hal. 855-874.
- Konhauser, K. (2007), *Introduction to Geomicrobiology*, Blackwell Publishing, United Kingdom.
- Kontoyannis, C.G., and Vagenas, N.V. (1999), "Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy", *Analyst*, Vol. 125., hal. 251-255.
- Kucharski, J. and Wyszowska, J. (2008), "Biological Properties of Soil Contaminated With The Herbicide Apyros 75 WG", *J. Elem.*, Vol. 13, no. 3, hal. 357-371.
- Krishnapriya, S., Babu, D.L.V., and Arulraj, P.G. (2015), "Isolation and identification of bacteria to improve the strenght of concrete", *Microbiological Research*, Vol. 174, hal: 48-55.
- Lay, W.B. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*, PT. Raja Grafindo, Jakarta.
- Lee, M.H., Mulrooney, S.B., Renner, M.J., Markowicz, Y., and Hausinger, R.P. (1992), "*Klebsiella aerogenes* Urease Gene Cluster: Sequence of *ureD* and Demostration that Four Accessory Genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) Are Involved in Nickel Metallocenter Biosynthesis", *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, no. 13, hal. 4324-4330.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., and Kim, Y.H. (2007), "Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments", *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 62, hal. 1-5.
- Li, J., Yang, G., Wu, M., Zhao, Y., and Zhou, S. (2014), "*Bacillus huizhouensis* sp. nov., isolated from paddy field soil", *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 105, no. 6, hal. 1-7.
- Li, P., and Qu, W. (2015), "Bacteria for concrete surface treatment", in *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*, Torgal, F.P., Labrincha, J.A., Diamanti, M.V., Yu, C.P., and Lee, H.K., Springer International Publishing, Switzerland, hal. 325-339.

- Liu, B., Liu, G.H., Sengonca, C., Schumann, P., Wang, M.K., Tang, J.Y., and Chen, M.C. (2014), “*Bacillus cihuensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a plant in the Cihu area of Taiwan”, *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 106, hal. 1147-1155.
- Liu, B., Liu, G.H., Zhu Y.J., Wang, J.P., Che, J.M., Chen, Q.Q., and Chen, Z. (2016), “*Bacillus loiseleuriae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil from a loiseleuria plant”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 66, hal. 2678-2683.
- Lowenstam, H.A. (1981), “Minerals formed by organisms”, *Science*, Vol. 211, hal. 1126-1131.
- Maciejewski, M., Oswald, H.R., and Reller, A. (1994), Thermal transformation of vaterite and calcite”, *Thermochimica Acta*, Vol. 234, hal. 315-328.
- Madden, T. (2013), “The BLAST Sequence Analysis Tool”, in *The NCBI Handbook* 2nd Edition, US.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., and Clark, D.P. (2012), *BROCK Biology of Microorganisms*, 13th edition, Benjamin Cummings, San Francisco.
- Mobley, H.L., Island, M.D., and Hausinger, R.P. (1995), “Molecular biology of microbial urease”, *Microbiol. Rev.*, Vol. 59, hal. 451-480.
- Morita, R.Y. (1980), “Calcite precipitation by marine bacteria”, *Geomicrobiol. J.*, Vol. 2, No. 1, hal. 63-82.
- Mortensen, B.M., Haber, M.J., De Jong, J.T., Caslake, L.F., and Nelson, D.C. (2011), “Effects of environmental factor on microbial induced calcium carbonate precipitation”, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 111, hal. 338-349.
- Mulyono, T. (2004), *Teknologi Beton*, Penerbit ANDI, Yogyakarta.
- Nehrke, G., and Cappellen, P.V. (2006), “Framboidal vaterite aggregates and their transformation into calcite: A morphological study”, *Journal of Crystal Growth*, Vol. 287, no. 2, hal. 528-530.
- Ng, S.W., Lee, M.L., Hii, S.L. (2012), “An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement”, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, Vol. 62, hal. 723–729.
- Ni, M., and Ratner, B.D. (2008), “Differentiation of Calcium Carbonate Polymorphs by Surface Analysis Techniques-An XPS and TOF-SIMS Study”, *Surf. Interface. Anal.*, Vol. 40, no. 10, hal. 1356-1361.
- Nonthapa, P., and Chanchao, C. (2015), “Pathogen detection and gut bacterial identification in *Apis cerana indica* in Thailand”, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 14, no. 49, hal. 3235-3247.
- Okwadha, G.D., and Li, J. (2010), “Optimum conditions for microbial carbonate precipitation”, *Chemosphere*, Vol. 81, no. 9. hal. 1143-1148.

- Overman, J. (2013), "Principle of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of procaryotes", in *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Association* Eds., Rosenberg, G., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., Springer, Heidelberg: Germany, hal. 149-207.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., and Krulwich, T.A. (2005), "Alkaline pH Homeostasis in Bacteria: New Insights", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1717, no. 2, hal. 67-88.
- Park, K.S., Iida, T., Yamaichi, Y., Oyagi, T., Yamamoto, K., and Honda, T. (2000), Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*", *Infect. Immun.*, Vol. 68, hal. 5742-5748.
- Parmar, A., Patel, A., and Shah, P. (2013), "Improvement of the Concrete Cracks by Using *Bacillus sphaericus*", *International Journal of Engineering Development and Research*, Vol. 2013, hal. 82-84.
- Peric, J., Vucak, M., Krstulovic, R., Brecevic, L., and Kralj, D. (1996), "Phase transformation of calcium carbonate polymorphs", *Thermochimica Acta*, Vol. 277, hal. 175-186.
- Perry, C.C. (2003), "Silicification: the processes by which organisms capture and mineralize silica", *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 54, hal. 291-327.
- Phillips, A.J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A.C., Cunningham, A.B., and Spangler, L. (2013), "Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review", *Biofouling*, Vol. 29, hal. 715-733.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (1993), *Microbiology*, 2nd edition, W. C. Brown Publishers, Dubuque, US.
- Radha, A.V., Forbes, T.Z., Killian, C.E., Gilbert, P.U.P.A., and Navrotsky, A. (2010), "Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 107, no. 38, hal. 16438-16443.
- Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., and Bang, S.S. (2001), "Remediation of concrete using microorganisms", *ACI. Mater. J.*, Vol. 98, hal. 3-9.
- Rasko, D.A., Ravel, J., Okstad, O.A., Helgason, E., Cer, R.Z., Jiang, L., Shores, K.A., Fouts, D.E., Tourasse, N.J., Angiuoli, S.V., Kolonay, J., Nelson, W.C., Kolsto, A.B., Fraser, C.M., and Read, T.D. (2004), "The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1", *Nucleic Acid Research*, Vol. 32, no. 3, hal. 977-988.
- Raupach, M., and Schiebl, P. (2001), "Macrocell sensor systems for monitoring of the corrosion risk of the reinforcement in concrete structure", *NDT and E. Int.*, Vol. 34, hal. 435-442.

- Reddy, N.B.P. (2011), "Basics for the Construction of Phylogenetic Trees", *WebmedCentral BIOLOGY*, Vol. 2011, no. 2, hal. 1-11.
- Reddy, M.S., Achal, V., and Mukherjee, A. (2012), "Microbial concrete, a wonder metabolic product that remediates the defects in building structures", in *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, eds. Satyanarayana, T., Johry, B.N., and Prakash, A., Springer Publishers, USA, hal. 547-568.
- Reed, K.E. (2001), "Restriction enzyme mapping of bacterial urease genes: using degenerate primers to expand experimental outcomes", *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol. 29, hal. 239-244.
- Riding, R. (2000), "Microbial carbonates: The geological records of calcified bacterial mats and biofilms", *Sedimentology*, Vol. 47, hal. 179-214.
- Rivadeneyra, M.A., Delgado, R., Delgado, G., Del Moral, A., Ferrer, M.R., and Ramos-Cormenzana, A. (1994), "Precipitation of carbonates by *Bacillus* sp. isolated from saline soil", *Geomicrobiol. J.*, Vol. 11, hal. 174-184.
- Rukmana, G. and Zulaika, E. (2017), "Bakteri Karbonoklastik dari Pegunungan Berkapur", *Jurnal Sains dan Seni ITS*, Vol. 6, no. 2, hal. 1-4.
- Saitu, N., and Nei, M. (1987), "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 4, no. 4, hal. 406-425.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition*, Laboratory Pr., New York.
- Sarada, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D., and Lele, S.S. (2009), "Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 36, hal. 1111-1115.
- Sarayu, K., Iyer, N.R., and Murthy, A.R. (2013), "Exploration on the Biotechnological Aspect of the Ureolytic Bacteria for the Production of the Cementious Materials-a Review", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 172, no. 5, hal. 2308-2323.
- Sharma, T.K., Alazhari, M., Heath, A., Paine, K., and Cooper, R.M. (2017), "Alkaliphilic *Bacillus* species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 122, hal. 1233-1244.
- Siddique, R., and Chahal, N.K. (2011), "Effect of ureolytic bacteria on concrete properties", *Construction and Building Materials*, Vol. 25, hal. 3791-3801.
- Skinner, A.J., LaFemina, J.P., and Jansen, H.J.F. (1994), "Structure and bonding of calcite: A theoretical study", *American Mineralogist* Vol. 79, hal. 205-214.

- Skinner, H.C.W., and Ehrlich, H. (2014), “Biogeochemistry”, dalam *Treatise on Geochemistry 2nd Edition*, eds. Holland, H.D., and Turekian, K.K., Elsevier Ltd., Netherlands, hal. 163-187.
- Soon, N.W., Lee, L.M., Khun, T.C., and Ling, H.S. (2013), “Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation”, *KSCE J. Civ. Eng.*, Vol. 17, hal. 718–728.
- Sondi, I., and Matijevic, E. (2001), “Homogenous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction”, *Journal of Colloid and Interfacial Science*, Vol. 238, hal. 208-214.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E.L., and Lynch, S.V. (2015), “Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens”, *PloS One*, Vol. 10, no. 2, hal. 1-22.
- Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., and Li, Y. (2013), “Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 29, hal. 1453–1460.
- Stackebrandt, E., and Ebers, J. (2006), “Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards”, *Microbiol. Today*, Vol. 33, hal. 152-155.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J., and Bang, S. (1999), “Microbiological precipitation of CaCO_3 ”, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 31, no. 11, hal. 1563-1571.
- Su, J., Jin, L., Jiang, Q., Sun, W., Zhang, F., and Li, Z. (2013), Phylogenetically Diverse *ureC* Genes and Their Expression Suggest the Urea Utilization by Bacterial Symbionts in Marine Sponge *Xestospongia testudinaria*”, *PlosONE*, Vol. 8, n0. 5, hal. 1-8.
- Tai, C.Y., and Chen, F.B. (1998), “Polymorphism of CaCO_3 , precipitated in a constant-composition environment”, *AIChE Journal*, Vol. 44, no 8, hal. 1790-1798.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (2012), *Microbiology An Introduction*, 11th Edition, Benjamin Cummings, USA.
- Tringe, S.G., and Hugenholtz, P. (2008), “A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene”, *Curr. Opin. Microbiol.*, Vol. 11, np. 5, hal. 442-446.
- Trushina, D.B., Bukreeva, T.V., Kovalchuk, M.V., and Antipina, M.M. (2014), “ CaCO_3 vaterite nanoparticles for biomedical and personal care application”, *Mater. Sci. Eng.*, Vol. 45, hal. 644-658.
- Twyman, R.M. (1998), *Advanced Molecular Biology: A Concise Reference*, Springer, New York.

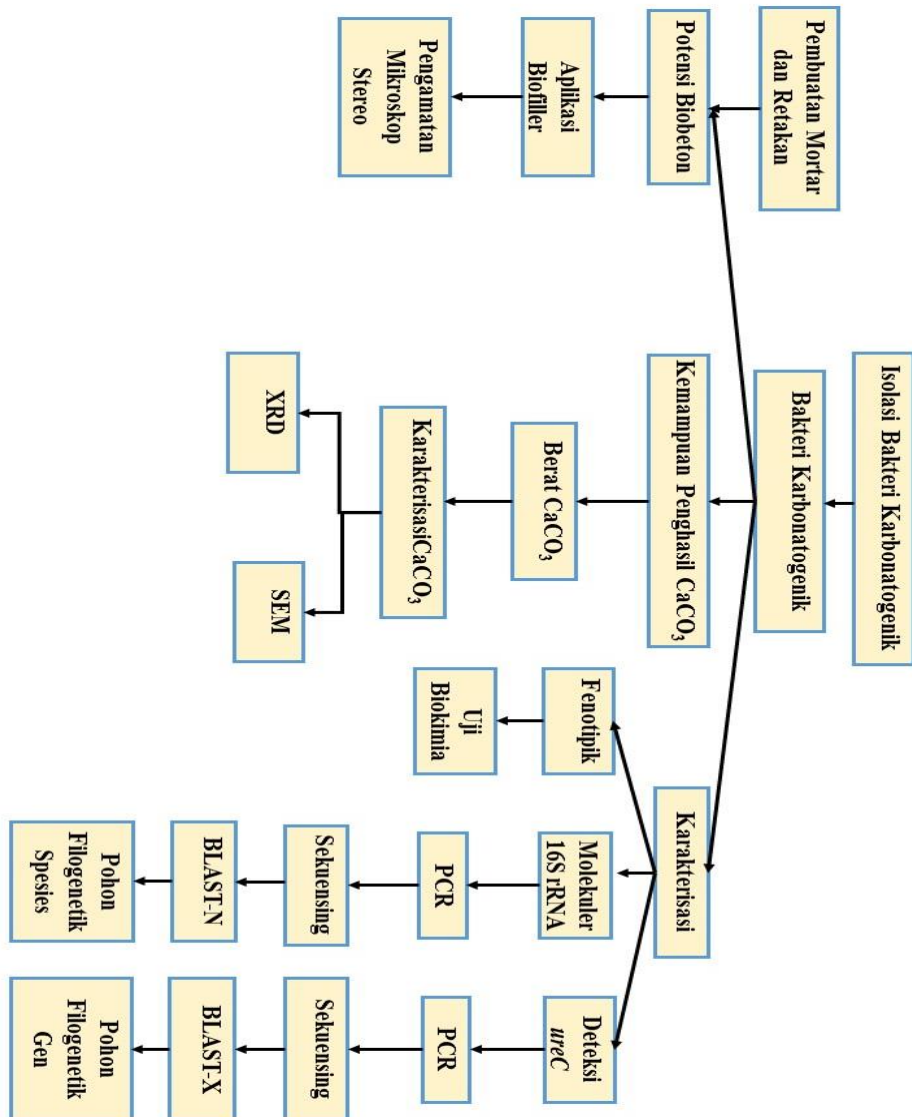
- Vahabi, A., Ramezaniapour, A.A., Sharafi, H., Zahiri, H.S., Vali, H., and Noghabi, K.A. (2015), "Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK 01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials", *J. Basic Microbiol.*, Vol. 55, no. 1, hal. 105-111.
- Vandamme, P., Pot, B., Gills, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996), "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics", *Microbiological Reviews*, Vol. 60, no. 2, hal. 407-438.
- Waluyo, L. (2007), *Mikrobiologi Umum*, UMM Press., Malang.
- Wang, J., and Becker, U. (2009), "Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO₃)", *Am. Mineral.* Vol. 94, hal. 380-386.
- Wang, J.Y., Soens, H., Verstraete, W. and De Belie, N. (2014), "Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores", *Cem. Concr. Res.*, Vol. 56, hal. 139-152.
- Wang, J., Ersan, Y.C., Boon, N., and De Belie, N. (2016), "Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 100, no. 7, hal. 2993-3007.
- Wei, H., Shen, Q., Zhao, Y., Wang, D.J., and Xu, D.F. (2003), "Influence of polyvinylpyrrolidone on the precipitation of calcium carbonate and on the transformation of vaterite to calcite", *J. Cryst. Growth Des.*, Vol. 250, hal. 516-524.
- Wei, S., Cui, H., Jiang, Z., Liu, H., He, H., and Fang, N. (2015), "Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol 46, no. 2, hal. 455-464.
- Whiffin, V.S., van Paassen, L.A., and Harkes, M.P. (2007), "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique", *Geomicrobiol. J.*, Vol. 24, hal. 417-423.
- Wiktor, V., and Jonkers, H.M. (2011), "Quantification of crackhealing in novel bacteria-based self-healing concrete", *Cem. Concr. Compos.*, Vol. 33, hal. 763-770.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., and Woolverton, C.J. (2016), *Prescott's Microbiology 10th Edition*, Mc. Graw. Hill. Education, New York.
- Worrel, E., Price, L., Hendricks, C., and Meida, L.O. (2001), "Carbon dioxide emission from the global cement industry", *Annu. Rev. Energy Environ.* Vol. 26, hal. 303-329.
- Yang, B., Wang, Y., and Qian, P.Y. (2016), "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis", *BMC Bioinformatics*, Vol. 17, hal. 135-142.

- Yarza, P., Yilmaz, P., Priesse, E., Glockner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., and Mora, R.R. (2014), “Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences”, *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 12., hal. 635-645.
- Yoshiyama, M., and Kimura, K. (2009), “Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood”, *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 102, hal. 91-96.
- Zhang, Z., Xie, Y., Xu, X., Pan, H., and Tang, R. (2012), “Transformation of amorphous calcium carbonate into aragonite”, *J. Cryst. Growth*, Vol. 343, hal. 62–67.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

LAMPIRAN 1. Skema Kerja

SKEMA KERJA PENELITIAN



LAMPIRAN 2. Komposisi Medium dan Reagen

KOMPOSISI MEDIUM & REAGEN

1. CCP (Calcium Carbonate Precipitation) Agar/ Liter (Wei *et al.*, 2015).

No.	Bahan	Jumlah
1.	Urea	20 gram
2.	NaHCO ₃	2.12 gram
3.	NH ₄ Cl	10 gram
4.	Nutrient Broth	3 gram
5.	CaCl ₂	30 mM
6.	Agar	20 ram

2. CCP (Calcium Carbonate Precipitation)/ Liter (Wei *et al.*, 2015).

No.	Bahan	Jumlah
1.	Urea	20 gram
2.	NaHCO ₃	2.12 gram
3.	NH ₄ Cl	10 gram
4.	Nutrient Broth	3 gram
5.	CaCl ₂	30 mM

3. Nutrient Broth Urea-Ca/ Liter (Hammad *et al.*, 2013).

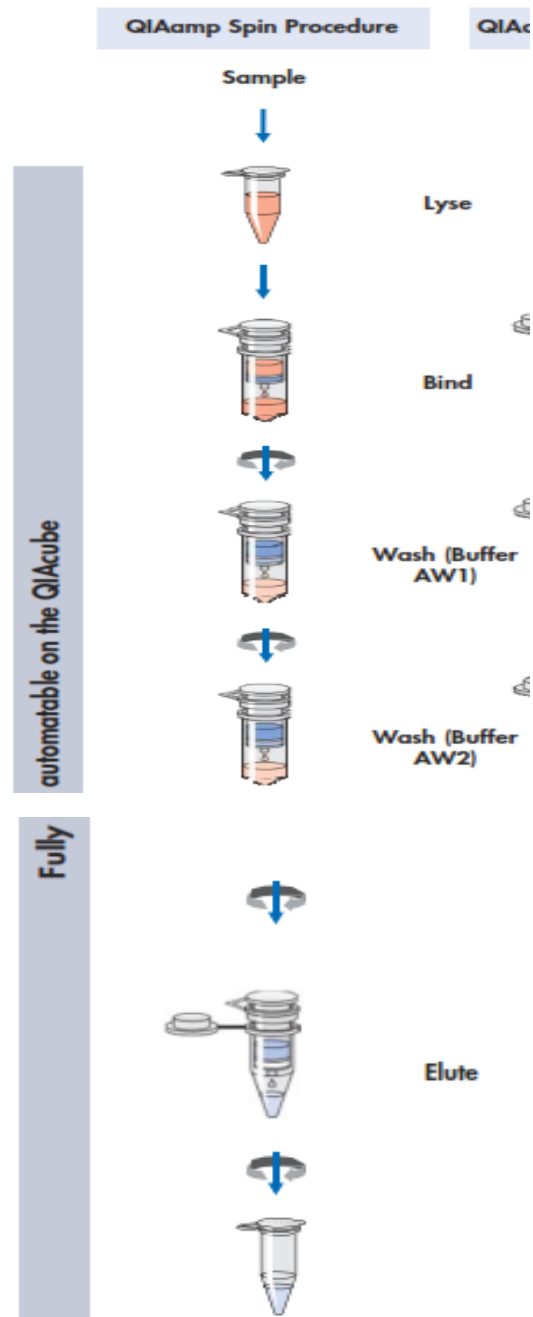
No.	Bahan	Jumlah
1.	Nutrient Broth	3 gram
2.	Urea	20 gram
3.	CaCl ₂	20 gram

4. OneTaq® Quick Load® 2X Master Mix with Standar Buffer (New England BioLabs).

No.	Bahan	Jumlah
1.	Tris-HCl pH 8.9	20 mM
2.	MgCl ₂	1.8 mM
3.	NH ₄ Cl	22 mM
4.	KCl	22 mM
5.	dNTPs	0.2 mM
6.	Gliserol	5%
7.	IGEPAL CA-630	0.06%
8.	Tween 20	0.05%
9.	Xylene Cyanol FF	-
10.	Tartrazine	-
11.	OneTaq DNA Polymerase	25 U/ml

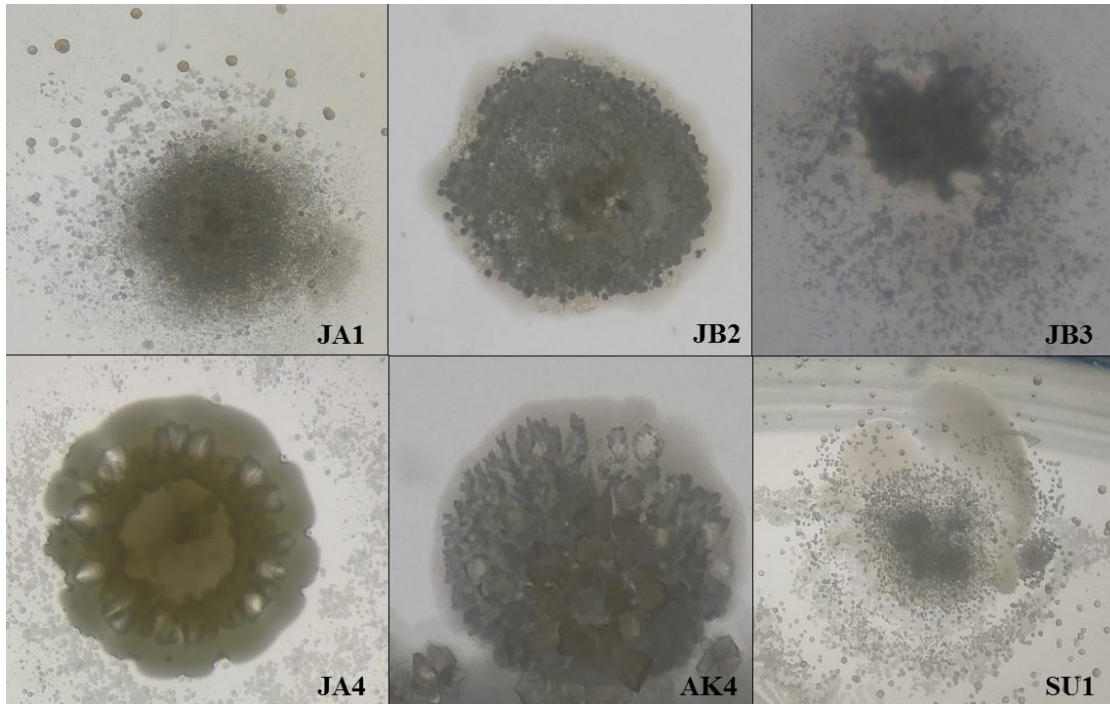
LAMPIRAN 3. Isolasi DNA

ILUSTRASI PROSES ISOLASI DNA

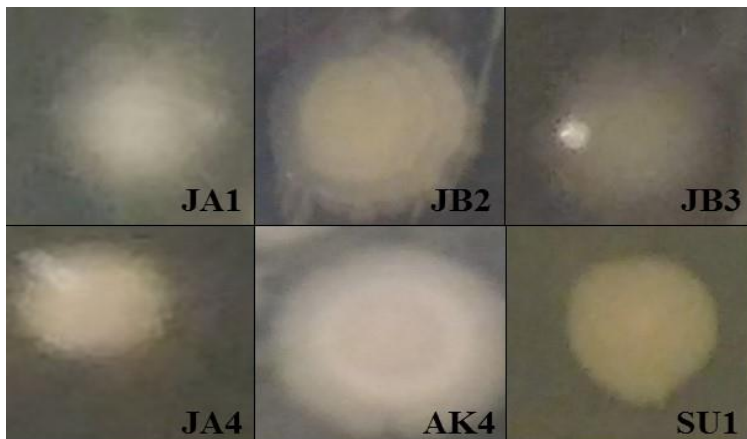


LAMPIRAN 4. Morfologi Koloni Bakteri

Morfologi Koloni Pada Medium CCP Isolasi

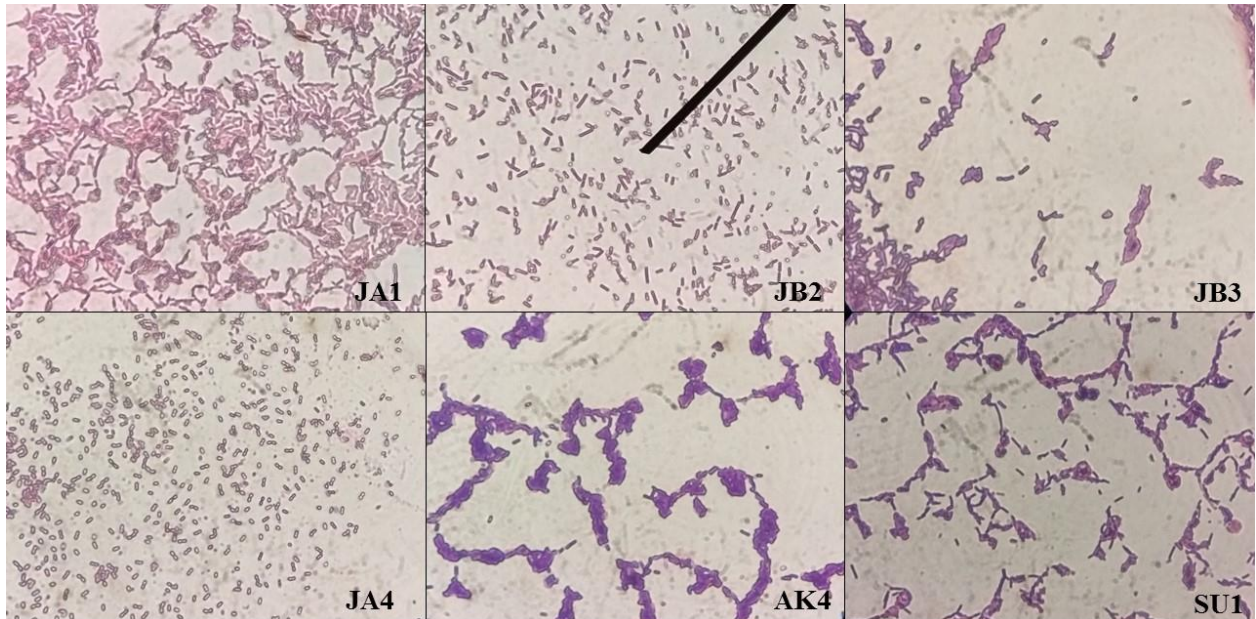


Morfologi Koloni Pada Medium NA

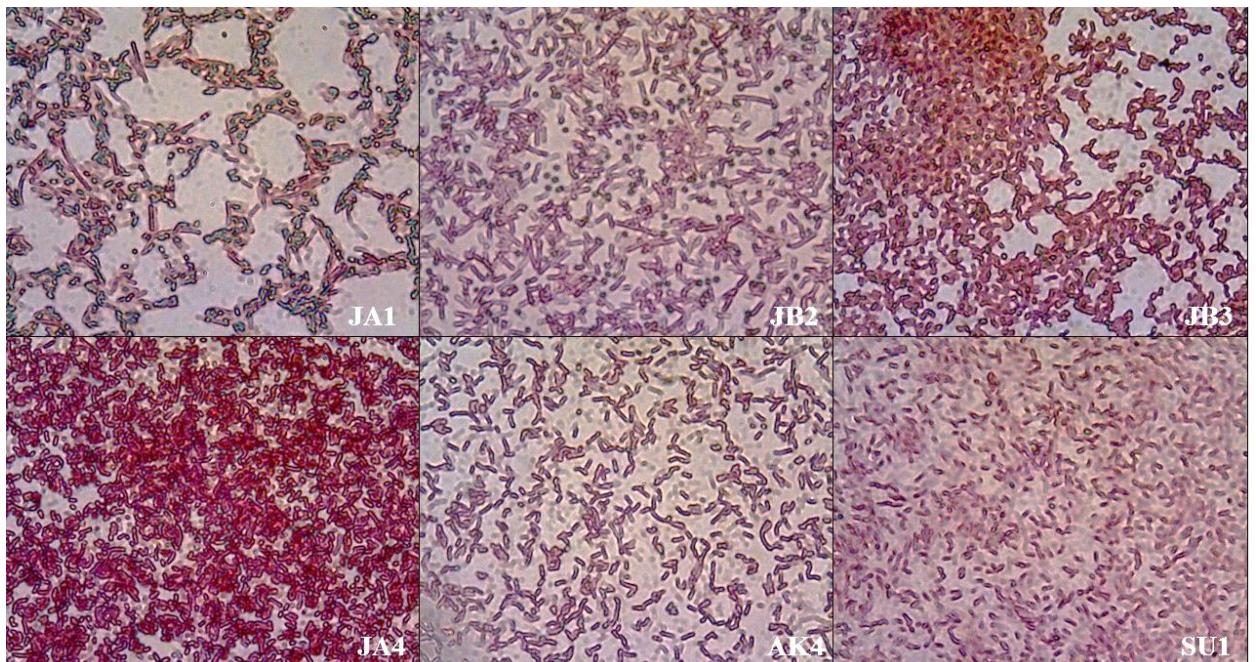


LAMPIRAN 5. Karakter Fenotip Isolat Bakteri

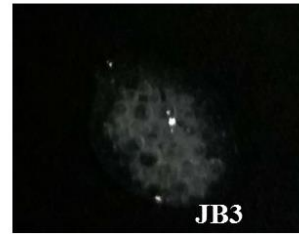
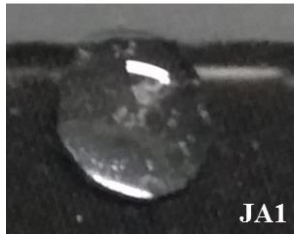
Pewarnaan Gram



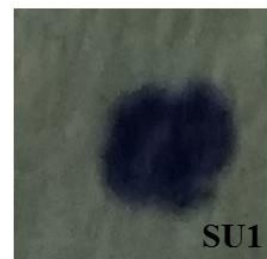
Pewarnaan Endospora



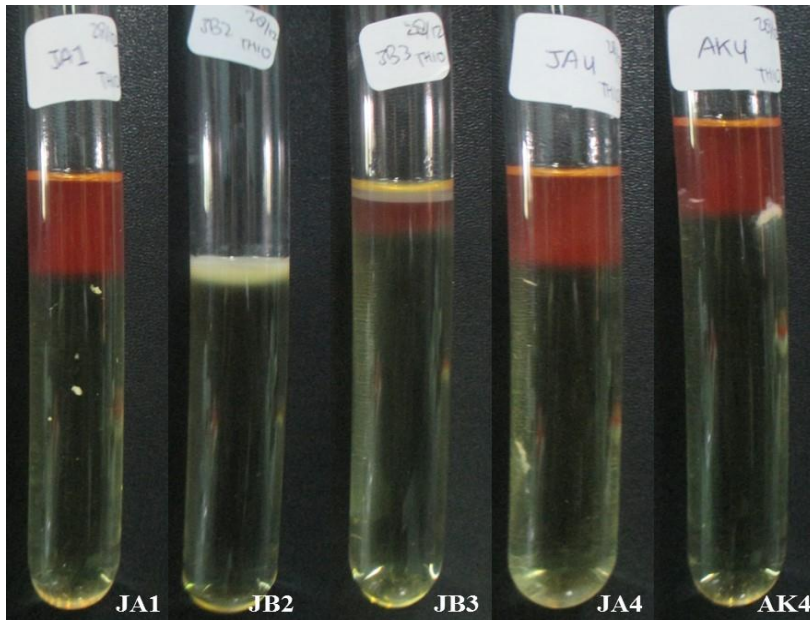
Uji Katalase



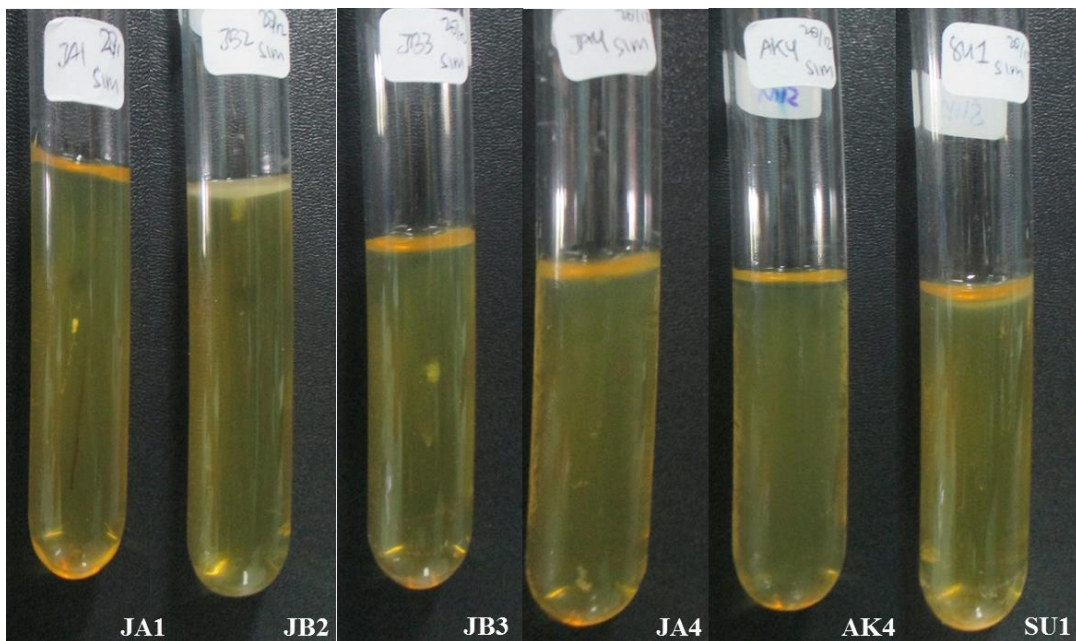
Uji Oksidase



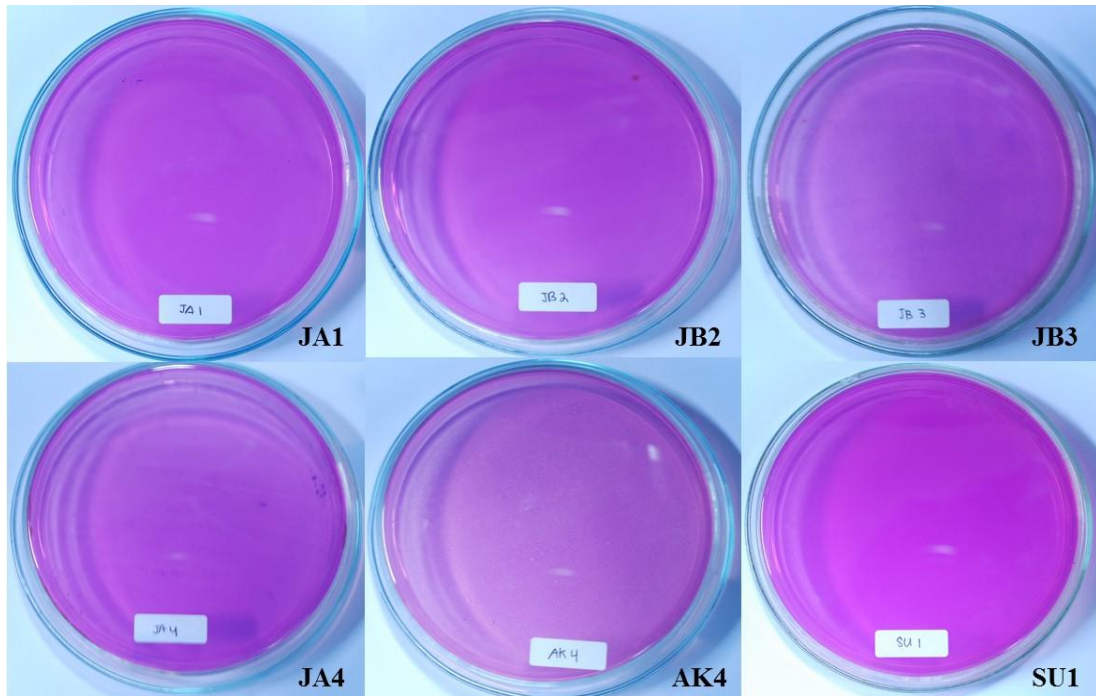
Uji Kebutuhan Oksigen



Uji Motilitas

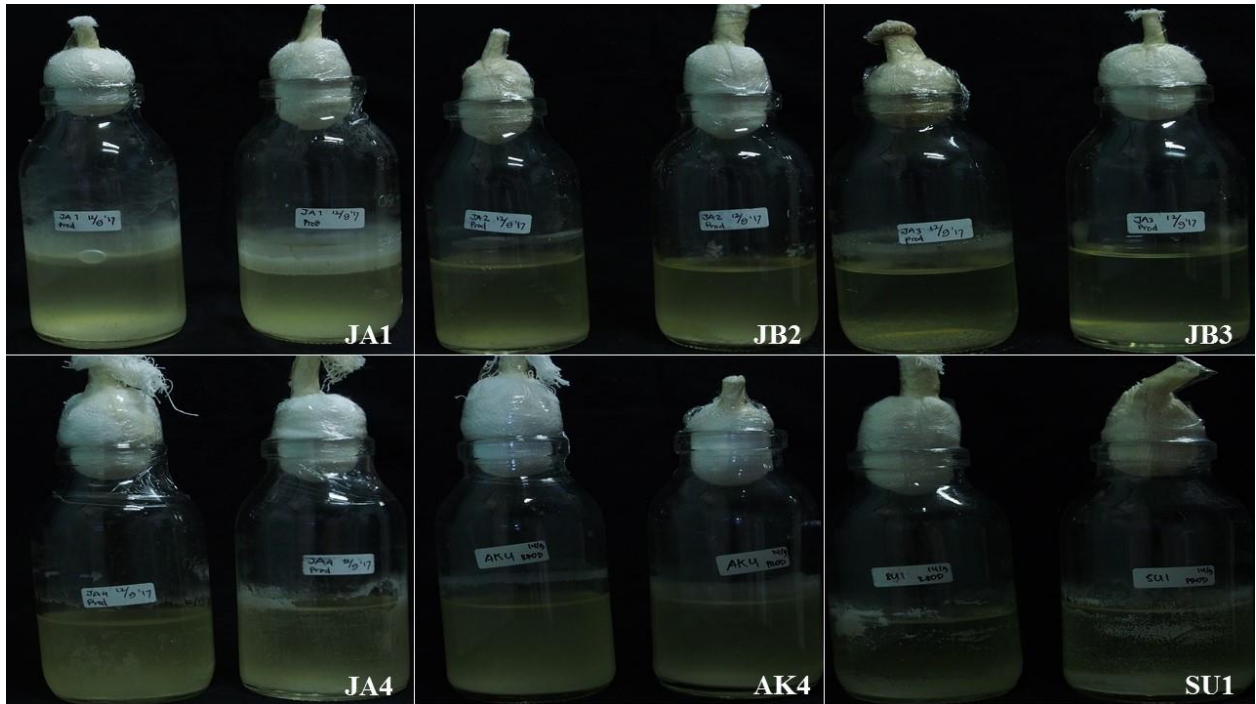


Uji urease



LAMPIRAN 6. Produksi Kristal CaCO_3

Gambar Medium Setelah Inkubasi



Gambar Kristal CaCO_3 yang Dipanen



LAMPIRAN 7. Data OD dan Berat CaCO₃

Data nilai OD 600nm untuk kurva pertumbuhan bakteri

No	Kode Isolat	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 jam	96 Jam	120 Jam	144 Jam	168 Jam
1	Sterilitas	0.0595	0.031	0.02	0.0045	0.002	0.004	0.005	0.006
2	JA 1	0.0785	0.052	0.6355	0.1855	0.131	0.144	0.125	0.121
3	JB 2	0.095	0.5785	0.8235	0.7585	0.579	0.6615	0.596	0.7255
4	JB 3	0.0745	0.4835	0.3165	0.3495	0.3255	0.3555	0.562	1.281
5	JA 4	0.0845	0.7965	0.671	0.6375	0.581	0.565	0.5465	0.558
6	AK 4	0.05	0.0585	0.6755	0.563	0.5015	0.488	0.4375	0.5535
7	SU 1	0.0375	0.0895	0.056	0.0375	0.036	0.057	0.113	0.1015

Data nilai OD starter dan berat CaCO₃

No	Kode Isolat	Berat 1	Berat 2	Nilai OD Starter	Rata-rata
1	JA 1	374.5	376.5	0.253	375.5
2	JB 2	327.6	414.4	1.0415	371
3	JB 3	222.3	333.5	0.475	277.9
4	JA 4	292.2	401.5	0.5415	346.85
5	AK 1	378	374.5	0.689	376.25
6	SU 1	358.1	295.7	0.154	326.9

LAMPIRAN 8. Kemurnian DNA dan Sekuen DNA

Data kemurnian DNA

Isolat	Abs. 260nm	Abs. 280nm	Kemurnian	Konsentrasi ng/μl
JA1	0.249	0.135	1.84	14.67
JB2	0.716	0.375	1.91	35.79
JB3	0.157	0.084	1.87	7.85
JA4	0.158	0.086	1.84	7.04
AK4	0.467	0.259	1.8	23.18
SU1	0.874	0.426	2.05	43.69

Sekuen gen 16S rRNA

Isolat JA1	TGGGAGCTTGCTCCCATGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCT GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATTTCTTTCTCGCAT GAGAAGAGATGGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGC TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCTG TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTAC CTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGA AAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGA AGGCGACTTTCTGGTCTGCAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGCCACTCCTAGAGATAGGACGTTCC CCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCA CTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGACCTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGAGTTGCGAACCCG CGAGGGTAAGCCAATCTTATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTGCCT ACAAGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACA
Isolat JB2	AGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCC TATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCAT GGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGC TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG

	<p>TAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGA</p> <p>AAGTGGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA</p> <p>AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTA</p>
Isola t JB3	<p>GGGAGCTTGCTCCCTGAAAATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTGTAAGCCTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATTTCTTTCTTCACATGGAGAGAGGTTGAAAGACGGCTTTGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTTACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGTGAGCGGTTCATTGGAACTGGAGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTATGCCTGCCCTAGAGATAGGGAGTTCCCTTCGGGGACATAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGAAATTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAATTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAGAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCTTAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGTGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGT</p>
Isola t JA4	<p>GGGAGCTTGCTCCCTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCAGTTTCTCCGCATGGAGAACTCTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTGCAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCT</p>

	AGTTGGTGGGATAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTTTTCGGATCGT AAAGCTCTGTTGTGAGGGAAGAACACGTGCGGGAGTAACTGCCCCGCGCATTGACGGTACC TCATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAA GCCCACGGCTCAACCGTGGAAGGTCAATTGGAACTGGGGGACTTGAGTACAGAAGAGGAA AGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAA GGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCC CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCA ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGCCCGGTATAGAGATATACCTTTCC CTTCGGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCAC TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAGAGGGTTGCCAACCCGC GAGGGGGAGCTAATCCATAAAACCGTTCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGG TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTAGGGT
Isola t AK4	TAGGAGCTTGCTCCTGTTGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTCCCTCTCAT GAGGGAAAGCTGAAAGTCGGTTTCGGCTGACACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGC TAGTTGGTGAGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTGCG TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTAC CTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAA AGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCAATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGG A AAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGA AGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCC TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCA ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGATTTTCCC CTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCAC TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGC GAGGTTTAGCCAATCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGG
Isola	GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC

t SU1	GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATTTCTTCTTCACATGGAGAGAGGTTGAAAGACG GCTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGG AAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGCGGAATTCCACGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTTTGGTCTGT AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAAC GCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCTCTGACCACCCTAGAGATAGGGCCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGA CAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACG AGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCA TAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT AGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG TCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAA
----------	--

Sekuen nukleotida gen *ureC*

Isolat JA1	TTGGGCCTTAAATTCACGAGGATTGGGGCAGTACGCTCTCGGTCAATTGATACATGTCTG CAATTGGCAGATGAAATGGATTTTCAAGTCCAAATCCATACGATACATTGAATGAGTCA GGTTTTATTGATGATACATTAGAAGCGATCGATGGCCGTACGATTCATGCTTATCATT GAGGGAGCAGGTGGAGGTCATGCTCCAGATATAATAAAGGCAGCTGGATATCCACATATC ATTCCGTCTTCCACGAATACCGACCAAATCACTTTTACGATTAATAACAGTAGATGAACA TCAGGACATGATGATGGTGTGCCACC
Isolat JB2	AAATTCATGAGGACTGGGGTGCCACACCAGCTGCACTCGATCAAAGTCTATCGGTGGCAG ATGAATATGATATTCAAGTTGCCCTCCACTCCGATACATTGAATGAAGCAGGGTTTGTAG AAGATACAATCAATGCGATTGATGGCCGTGTCATTATATTTCCATACGGAAGGTGCGG GTGGCGGTGATGCTCCAGACCAATTAGTGATGGCATCCTTACCTAATATTTTGCCAGCAT CGACGAATCCTACGAAACCGTTTACGACAAACACGATTGATGCATTTAGACATGATAATG GT
Isolat JB3	TTGGGCCTTAAATTCATGAGGATTGGGGGGCCACGACTTCCTCATTAGATTATTCCTT CGCGTGGCTGATAAATATGATGTTTCAGGTTGCTCTTCATGCAGATACATTGAATGAAGGA GGATTTATGGAAAACACGATGAAAGCTGTGAAAGATCGTGTAATCCATATGTATCATACG GAAGGAGCTGGCGGAGGGCATGCTCCTGACTTAATCAAATCAGCCGGGATGATGAATGTA TTGCCATCCTCTACCAATCCAATATGCCTTATACAAGTCAATACGATTGATGAACATCT AGACATGATTATGGTGTGCCAC
Isolat	ATTTTGGGCCTTAAATTCATGAGGATTGGGGTGCGACTCCGGCGTCAATCGATCGCAGC

JA4	TTGACAGTAGCTGACGAAGCTGACATCCAAGTTGCTATTCACCTCGGATACATTGAACGAA GCAGGATTCCTTGAAGATACACTTCGTGCAATTAACGGCCGTGTAATTCACCTCATTCCAC GTTGAAGGTGCAGGCGGTGGACACGCTCCTGACATTATGGCAATGGCTGGACATCCAAAC GTATTGCCTTCTTCAACAAACCCGACAAGACCATTACGTTAACACAATTCGATGAGCACC TAGACATGATAATGGTGTGCCAC
Isolat AK4	TTGGGCCTTAAAATTCATGAGGATTGGGGTGCTACAGGTTCTGTCTTGACTACGCACTC CGGGTAGCGGATCAATATGATATTCAAGTCGCCCTCCACGCAGATACATTAAATGAAAGT GGATTTATGGAGCAAACCATGGCTGCTGTGAAAGATAGAGTACTTCATATGTACCATACC GAAGGCGCTGGAGGCGGACATGCACCCGATTTAATTAATCAGCCGGTTACCATAACATT TTACCTTCTTCAACAAACCCCTACCCTCCCTTATACTGTCAATACAATTGATGAACACCTT GACATGATAATGGTGTGCCACC
Isolat SU1	TTGGGCCTTAAAATTCATGAGGATTGGGGAGCAACATTTTCATCCATTGACCATTCTTTA GAAGTAGCAGACAAATACGATGTTCAAGTAGCGTTACATGCTGATACATTAAATGAGGGC GGCTTTGTTGAAAATACGATGGCTGCATTAAGGAAGAGTCATCCATTATTCCATACA GAAGGTGCTGGAGGTGGCCATGCTCCAGACATCATCAAGGTTGCAAGCTATATGAACGTT CTCCCGGCTTCCACAAATCCAACACTCCCATTACGGTAATACAATTGACGAGCCTTAGA CATGTTAATGGTGTGCCACC

Urutan asam amino ureC

Isolat JA1	LGLKIHEDWGSTLSVIDTCLQLADEMDFQVQIHTDTLNESGFIDDTLEAIDGRTIHAYHI EGAGGGHAPDIIKAAGYPHIIPSTNTDQITFTIN
Isolat JB2	IHEDWGATPAALDQSLVADEYDIQVALHSDTLNEAGFVEDTINAIDGRVIHIFHTEGAG GGHAPDQLVMASLPNLPASTNPTKPFTTNTID
Isolat JB3	LGLKIHEDWGATTSSLDYSLRVADKYDVQVALHADTLNEGGFMENTMKAVKDRVIHMYHT EGAGGGHAPDLIKSAGMMNVLPSTNPTMPYT
Isolat JA4	GLKIHEDWGATPASIDRSLTVADEADIQVAIHSDTLNEAGFLEDTLRAINGRVIHSFHVE GAGGGHAPDIMAMAGHPNVLPSTNPTNPTPL
Isolat AK4	LGLKIHEDWGATGSCLDYALRVADQYDIQVALHADTLNESGFMEQTMAAVKDRVLHMYHT EGAGGGHAPDLIKSAGYHNILPSSTNPTLPYTVNTIDEHLDMMIMVCH
Isolat SU1	GLKIHEDWGATFSSIDHSLEVADKYDVQVALHADTLNEGGFVENTMAALKGRVIHSFHTE GAGGGHAPDIIKVASYMNVLPASTNPTLPFTV

LAMPIRAN 9. Data Tutupan Retakan Pada Mortar

NO	Spesimen	Titik	Hari	Isolat						
				JA1	JB2	JB3	JA4	AK4	SU1	Kontrol
1	Mortar 1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	v	v	0	v	0	0	0
			10	v	v	0	v	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	v	v	0	v	0	0	0
			10	v	v	0	v	v	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	v	v	0	v	0	0	0
			10	v	v	0	v	v	0	0
2	Mortar 2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	0	v	0	v	0	0	0
			10	0	v	0	v	0	1	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	v	v	0	v	0	0	0
			10	v	v	0	v	v	v	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0
			4	0	0	0	0	0	0	0
			6	0	0	0	0	0	0	0
			8	v	v	0	v	0	0	0
			10	v	v	0	v	v	v	0

Keterangan: v: positif; -: negatif

“Halaman ini Sengaja dikosongkan”.